

## 広島県衛生研究所研究報告

## 第35号

1988年11月

## 目次

## 原 著

- インフルエンザウイルス分離における検体接種  
細胞培養プレートの遠心効果  
妹尾 正登, 高尾 信一, 武井 直己 ..... 1

## 資 料

- 冷却塔水からの *Legionella* 属菌検出状況  
柳 美代子 ..... 7
- 1987年広島県内で流行した手足口病について  
高尾 信一, 妹尾 正登, 武井 直己 ..... 13
- 神経芽細胞腫のマス・スクリーニングについて  
一ろ紙尿のクレアチニン低値とVMA, HVA値に関する考察—  
水田 満里, 瀬川 和幸, 海佐 裕幸 ..... 19
- 広島県の鉱泉水質組成の検討  
中村 寿夫, 中富 美津江 ..... 25
- 新しいメチル化剤トリメチルシリルジアゾメタンを用いた  
食品中の安息香酸, サッカリンの分析  
松尾 健, 金森 久幸, 坂本 征則 ..... 33
- 他誌掲載論文要約 (1987年11月~1988年10月) ..... 41

広島県衛生研究所

〔〒734〕 広島市南区宇品神田1丁目5—70

## インフルエンザウイルス分離における 検体接種細胞培養プレートの遠心効果

妹尾正登\* 高尾信一\* 武井直巳\*

### Effect of Centrifugation of Infected Cell Plate on Isolation of Influenza Viruses

MASATO SENO\*, SHINICHI TAKAO\* AND NAOMI TAKEI\*

(Received Oct. 31, 1988)

#### Summary

Effect of centrifugation of Maidn-Darby Canine Kidney (MDCK) cell monolayer infected with clinical specimen on the isolation rate and/or yield of influenza virus from specimen was investigated in order to make fast and efficient isolation of this virus from the clinical specimens. Centrifugation of MDCK cell monolayer was made after inoculation with the specimen at 700 xg for 60 min at ambient temperature.

When the centrifugation was performed in a preliminary experiment using some influenza virus strains, 10-fold higher hemagglutinating activity than that in uncentrifuged controls was observed in 7 of 8 strains in the primary culture. And the yield of the virus obtained in the primary culture in centrifuged group was significantly higher than that in uncentrifuged one, while these effects were not observed in the secondary culture. Also in the isolation of influenza virus from clinical specimens, 6 of total 9 influenza virus strains have already been isolated in the primary culture by the centrifugation method. The isolation rate was twice as much as that obtained in the uncentrifuged controls.

These findings suggest that the centrifugation method is available for a fast and efficient isolation of influenza virus from clinical specimens.

*Key words: Influenza virus, Centrifugation, MDCK cell, Isolation.*

#### 緒 言

インフルエンザは、今なお有効な治療薬も見出されておらず、予防面においてもその原因であるインフルエンザウイルスの粒子表面の抗原性が変化しやすいため〔1

—4〕、ワクチンによっても未だコントロールされるに至っていない。インフルエンザはその流行によって多数の罹患者をみるばかりでなく、それによって超過死亡の原因となることもあって〔5—9〕、臨床的に軽視できない疾患である。

\*広島県衛生研究所：Hiroshima Prefectural Institute of Public Health

Table 1. Influenza Virus Strains Used

Strain No.	Virus (subtype)	History	HA titer
1	A/Hiroshima/1/86(H1N1)	M-5	1:256
2	A/Hiroshima/12/85(H3N2)	M-3	1:128
3	B/Hiroshima/20/84	M-4, E-1, M-2	1:512
4	A/Hiroshima/1/86(H1N1)	E-3	1:1,024
5	A/Hiroshima/1/87(H1N1)	E-3	1:1,024
6	A/Hiroshima/12/85(H3N2)	E-3	1:64
7	B/Hiroshima/20/84	M-4, E-2	1:128
8	B/Hiroshima/6/85	E-4	1:128

M: MDCK

E: Embryonated hen's egg

インフルエンザウイルスの分離は、臨床的にその類症鑑別が不可能であることから、患者の診断に重要であるばかりでなく、それにましてインフルエンザ防御対策を立てる上で欠くことのできないものである。そのため本ウイルスの分離に当っては、その早期分離と分離率の向上が強く求められている。現在インフルエンザウイルスの分離は、発育鶏卵、PRMK細胞、MDCK細胞等を用いた方法で行われており〔1, 10〕, またその迅速診断についても種々の試みがなされている〔11-16〕。

著者らは、臨床材料からのインフルエンザウイルスの早期分離と分離率の向上を目的として、通常 MDCK細胞を用いた分離過程における吸着段階に着目し、検体接種後の細胞培養プレートを遠心することをインフルエンザウイルス分離株(分離株)および実際の臨床材料について試み、その分離におよぼす効果について検討したので報告する。

#### 材料および方法

##### 1. 分離株を用いた実験

分離株は Table 1 に示すような当所において分離した Aソ連型(H1N1) 3株, A香港型(H3N2) 2株および B型 3株の計 8株を供試した。

MDCK細胞の単層培養を 24穴の細胞培養プレート(Coster製)に各供試ウイルスについて 2枚あて作製し、PBS(-)で洗浄後それぞれの 4穴に供試ウイルスの 10倍階段希釈液を 0.2 ml/穴あて接種し、1枚を遠心群、他を対照群とした。遠心群はウイルス液接種後の細胞培養プレートを約 23°C, 2,000 rpm (700 × g) 1時間遠心を行い、対照群は遠心することなくそのまま 34°C 炭酸ガスふ卵器にて 1時間吸着を行った。その後両群ともに維持培地 (20 μg/ml Trypsin-0.2% BSA-2.25 μg/ml NaHCO<sub>3</sub>-Dulbecco 変法培地) を 1 ml/穴加え、34°C

炭酸ガスふ卵器にて 5日間培養した。ウイルス増殖の有無は、0.5%ニワトリ赤血球による赤血球凝集(HA)試験によった。培養プレートを 1回凍結融解後同一希釈の 4穴の培養液をプールし、HA陽性のものは HA価 1:1に希釈し、また HA陰性のものはそのまま接種して同様に 2代まで継代培養した。

##### 2. 臨床材料からのウイルス分離実験

1987年11月から1988年6月までの間に結核・感染症サーベイランス事業および流行予測調査等によって採取された上気道疾患例の咽頭ぬぐい液 184検体を供試し、各咽頭ぬぐい液の 3,000 rpm 30分遠心後の上清を接種検体とした。分離培養等は前述の分離株を用いた実験の場合と同様に行い、3代まで継代し分離を試みた。なおこれに併せて発育鶏卵による分離も常法〔1〕に従い 3代まで行った。

実験結果については、Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test〔17〕により統計学的検討を行った(両側検定  $P < 0.05$ )。

#### 結 果

##### 1. 分離株を用いた実験

分離株を用いての実験結果を Table 2 に示した。培養初代において、遠心群では対照群と比べて 10倍高希釈でも HA陽性を示したものが 8株中 7株に認められ、対照群と遠心群間に統計学的有意差が認められた ( $P < 0.05$ )。継代 2代目では、対照群と比べて高希釈で HA陽性を示すものが 5株 (No. 3, 4, 5, 7, 8株) 認められたが、それらはいずれも初代において差が認められていたものである。No. 1, 2株は継代 2代目では差がみられなかった。No. 6株は逆に遠心群に比べて対照群の方が 10倍高希釈で HA陽性となった。継代 2代目では、対照群と遠心群間に統計学的有意差は認められなかった。

Table 2. Yields of Virus of Each Assay with and without Centrifugation

Strain No.	Culture	Yields of virus (HAU)	
		Centrifugation -	Centrifugation +
1	Primary	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>
	Secondary	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>
2	Primary	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>
	Secondary	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>
3	Primary	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>
	Secondary	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>
4	Primary	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>
	Secondary	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>
5	Primary	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>
	Secondary	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>
6	Primary	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>
	Secondary	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>
7	Primary	10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup>
	Secondary	10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup>
8	Primary	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>
	Secondary	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>

2. 臨床材料からのウイルス分離実験

臨床材料からのウイルスの分離結果を Table 3 に示した。MDCK 細胞および発育鶏卵を用いて、A 型 (H3N2) 2 株、B 型 13 株の計 15 株を分離することができたが、このうち MDCK 細胞で分離されたのは B 型の 10 株であった。これらの分離例のうち対照群に比べて少ない継代数で分離されるか、または対照群では分離されなかったが遠心群では分離された株数は、計 6 株であった。さらにこのうち対照群および発育鶏卵においても分離されず、遠心群でのみ分離された株数は 4 株であった。逆に対照群において遠心群に比べ少ない継代数で分離されるか、または遠心群では分離されなかったのに対し対照群では分離されたものがそれぞれ 1 株ずつ計 2 株みられた。発育鶏卵のみにより分離されたものは、5 株であった。

以上の結果を各分離系別に各継代次における集積分離株数をまとめて Table 4 に示した。継代 3 代までにそれぞれの系で分離された株数は、対照群 6 株、遠心群 9 株、発育鶏卵 7 株であった。遠心群についてみると、対照群において 3 代継代までに分離できたと同数の 6 株を初代培養において分離しており、これは対照群の初代培養における分離株数の 2 倍であり、最終的には対照群との差は 3 株であった。しかしながら、この成績からは、対照群と遠心群との間に統計学的に有意差を示す結果は得られなかった。

Table 3. Isolation of Virus from Throat Swabs

Isolates	MDCK		Embryonated hen's egg
	Centrifugation -	Centrifugation +	
B/Hiroshima/1/88	1*	1	—**
B/Hiroshima/2/88	—	1	—
B/Hiroshima/3/88	1	—	3
B/Hiroshima/4/88	—	1	—
B/Hiroshima/5/88	—	1	—
B/Hiroshima/6/88	2	1	—
B/Hiroshima/7/88	—	2	—
B/Hiroshima/8/88	1	2	—
B/Hiroshima/9/88	3	3	2
B/Hiroshima/10/88	—	—	2
A/Hiroshima/11/88(H3N2)	—	—	3
B/Hiroshima/12/88	2	1	—
A/Hiroshima/13/88(H3N2)	—	—	1
B/Hiroshima/14/88	—	—	2
B/Hiroshima/15/88	—	—	2

\*: Virus was isolated at primary culture, 1; secondary culture, 2 and 3rd culture, 3; respectively.

\*\* : Virus was not isolated (within 3rd passage).

Table 4. Accumulated No. of Isolates in Each Culture

Passage number	MDCK		Embryonated hen's egg
	Centrifugation -	Centrifugation +	
1	3	6	1
1—2	5	8	5
1—3	6	9	7

考 察

インフルエンザが臨床症状から適確に診断できない現状で、臨床面においてインフルエンザウイルスを検出する迅速診断法の必要性が強く求められ、鼻咽腔からの材料を直接または 1 度細胞に接種した後に実施する直接および間接免疫蛍光抗体法 [12, 13, 15, 16] による検出法が有用な方法として進歩してきている。また、ELISA [11] や RIA [14] による検出も試みられている。しかし、これらの迅速診断法が臨床的に有用であっても、なお最終的には、ウイルス分離は臨床診断を確固なものとする

するため〔12, 18, 19〕にも、またははじめにも述べたように予防面において今後の検討を加えていくため〔10〕にも是非とも必要とされるものである。しかもそれがためには早期分離および分離率の向上が要求されることは言うまでもない。それに関連して Weiss ら〔20〕は、クラミジアの分離に当って、培養細胞への吸着段階で検体接種後、平底試験管を遠心することによって分離率が向上することを報告し、この方法がクラミジアの分離には広く用いられている。インフルエンザウイルスについては、Espy ら〔12〕が迅速診断法の蛍光抗体法によるウイルスの検出に当って、A (H3N2) 型株を用いて吸着段階の培養細胞パイアルビンを遠心することを試み、感度の上昇をみたしと報告している。

今回著者らはインフルエンザウイルスの分離に当って、吸着段階の培養細胞プレートを遠心することを試みた。

分離株を用いた実験では、培養初代において8株中7株に对照群に比べて10倍高希釈でもHA陽性が認められ、統計学的にも对照群と遠心群間に有意の差が認められた。このことは、実際の臨床材料からのインフルエンザウイルスを分離する場合において、検体中のウイルスが通常の方法で分離される量の10分の1であっても、ウイルスが分離される可能性を示唆するものであり、早期分離および分離率の向上にこの方法が有用であることを示すものである。継代2代において、对照群と遠心群との間に差がみられなかった2株(No.1および2株)は初代培養においてすでに遠心群において10倍高希釈でHA陽性を示していることから、初期の目的は半ば達せられたものと考えられる。一方初代培養においては両群間に差がみられなかったものの、継代2代では、逆の結果を示した例が1株(No.6株)認められた。その理由については不明であるが、全体的にみて吸着段階における細胞培養プレートを遠心することの効果を否定するものではないと考える。

以上の結果を基にして行った臨床材料からのウイルス分離実験においては、MDCK細胞によって分離された10株のうち遠心群では初代培養において6株を分離することができた。これは对照群でのその2倍であり、またこれは对照群における継代3代までの分離株数と同数であった。継代2代、3代においては、両群共にそれぞれ1~2株が追加されたのみで、2代以降における遠心の効果は明らかでなかったが、このことは逆に初代での分離過程がその後の分離率に大きな影響を与えることを示しているとも考えられる。分離株のうち对照群にお

いて分離され遠心群では分離されなかった株は発育鶏卵では、継代3代で分離されている。検体中のウイルス量が非常に少なかったことも考えられる。

以上の実験成績から、臨床材料からのインフルエンザウイルスのMDCK細胞による分離に当って、これまでの34°C 1時間吸着に代え、検体接種後の細胞培養プレートを遠心することで、そうでない对照群との間に統計学的な有意差は認められなかったものの、培養初代で对照群に倍する分離を得ていることから全体的傾向としては、早期分離および分離率の向上に役立つと思われる。そのメカニズム等については今後実験を重ね追究していきたいと考えている。最終的に遠心群と对照群の間に有意差の認められなかった点に関しては、ウイルスの分離例数が少なく両群の比較には標本数としてやや少なかったこと、また接種検体中のウイルス量あるいはそのばらつき状態等にも大きく影響されるものと考えられる。なお分離例のうち5例は発育鶏卵のみで分離されており、分離率向上にはMDCK細胞による分離と併行して発育鶏卵による分離も実施する必要があると思われた。

## 要 約

MDCK細胞を用いたインフルエンザウイルスの分離において、早期分離および分離率の向上を目的に検体接種後の細胞培養プレートを遠心する方法による遠心群と、通常の方法による对照群との比較を行い、遠心の効果について検討した。

インフルエンザウイルス分離株8株を用いての実験では、培養初代において遠心群では对照群に比べ10倍高希釈でもHA陽性となる株が7株みられ、両群間に統計学的に有意差が認められた。しかし継代2代では、両群間に有意差は認められなかった。

臨床材料からのウイルス分離実験では、培養初代において遠心群では、对照群の2倍の6株が分離されたが、これは継代3代までに对照群で分離することのできた分離株数と同数であった。継代3代までに遠心群では計9株が、对照群では計6株が分離されたが、両群間に統計学的有意差は認められなかった。しかし分離初代の成績等から検体接種後の細胞培養プレートを遠心することは、インフルエンザウイルスの早期分離および分離率の向上に有用であると思われた。

## 文 献

- 〔1〕 Dowdle, W. A., Kendal, A. P. and Noble, G. R. (1979): Diagnostic procedures for viral,

- rickettsial and chlamydial infections. 5th Ed., p. 585—609, Washington, D.C., American Public Health Association.
- [2] Archetti, I. and Horsfall, F.L. (1950): Persistent antigenic variation of influenza A viruses after incomplete neutralization in ovo with heterologous immune serum. *J. Exp. Med.*, 92, 441—462.
- [3] Choppin, P.W., Osterhout, S. and Tamm, I. (1958): Immunological characterization of New York strain of influenza A virus from the 1957 pandemic. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 98, 513—520.
- [4] Davenport, F.M., Hennessy, A.V. and Francis, T. Jr. (1953): Epidemiologic and immunologic significance of age distribution of antigenic variants of influenza virus. *J. Exp. Med.*, 98, 641—656.
- [5] Barker, W.H. and Mullooly, J.P. (1980): Impact of epidemic type A influenza in a defined adult population. *Am. J. Epidemiol.*, 112, 798—813.
- [6] Housworth, J. and Langmuir, A.D. (1974): Excess mortality from epidemic influenza, 1957—1966. *Am. J. Epidemiol.*, 100, 40—48.
- [7] 河合 道, 福富和夫, 杉浦 昭(1980): インフルエンザと超過死亡 (1966—1978). *臨床とウイルス*, 8(1), 53—57.
- [8] Langmuir, A.D. and Housworth, J. (1969): A critical evaluation of influenza surveillance. *Bull. WHO*, 41, 393—398.
- [9] Palese, P. and Young, J.F. (1982): Variation of influenza A, B, and C viruses. *Science*, 215, 1468—1474.
- [10] 根路銘国昭 (1978): MDCK 細胞におけるインフルエンザウイルスの分離. *臨床病理, 臨時増刊特集* 35号, 111—124.
- [11] Coonrod, J.D., Karathanasis, P., Betts, R. F. and Donofrio, J.C. (1988): Enzyme-linked immunosorbent assay of core antigens for clinical diagnosis of influenza. *J. Med. Virology*, 25, 399—409.
- [12] Espy, M.J., Smith, T.F., Harmon, M.W. and Kendal, A.P. (1986): Rapid detection of influenza virus by shell vial assay with monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.*, 24(4), 677—679.
- [13] Freke, A., Stott, E.J., Roome, A.P.C.H. and Caul, E.O. (1986): The detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates: Assessment, formulation, and evaluation of monoclonal antibodies as a diagnostic reagent. *J. Med. Virology*, 18, 181—191.
- [14] Meurman, O., Sarkkinen, H., Ruuskanen, O., Hänninen, P. and Halonen, P. (1984): Diagnosis of respiratory syncytial virus infection in children: Comparison of viral antigen detection and serology. *J. Med. Virology*, 14, 61—65.
- [15] Minnich, L. and Ray, C.G. (1980): Comparison of direct immunofluorescent staining of clinical specimens for respiratory virus antigens with conventional isolation techniques. *J. Clin. Microbiol.*, 12(3), 391—394.
- [16] Shalit, I., Mckee, P.A., Beauchamp, H. and Waner, J. (1985): Comparison of polyclonal antiserum versus monoclonal antibodies for the rapid diagnosis of influenza A virus infections by immunofluorescence in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 22(5), 877—879.
- [17] Siegel, S. (1956): *Nonparametric Statistics for the Behavioural Sciences*. p. 75—83, New York, McGraw-Hill Book Co., Inc..
- [18] Centers for Disease Control (1985): Prevention and control of influenza. Recommendation of the immunization practices advisory committee. *Ann. Intern. Med.*, 103, 560—565.
- [19] Dolin, R., Reichman, R.C., Madore, H.P., Maynard, R., Linton, P.N. and Weber-Jones, J. (1982): A controlled trial of amantadine and rimantadine in the prophylaxis of influenza A infection. *N. Engl. J. Med.*, 307, 580—583.
- [20] Weiss, E. and Dressler, H.R. (1960): Centrifugation of rickettsiae and viruses onto cells and its effect on infection. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 103, 691—695.

冷却塔水からの *Legionella* 属菌検出状況

榎 美代子\*

Isolation of *Legionella* Species from Cooling Tower Water

MIYOKO SAKAKI\*

(Received Oct. 31, 1988)

## はじめに

前報〔1〕においてビルの冷却塔水から *Legionella* 属菌の分離を試み *L. pneumophila* serogroup (SG) 1 を分離したことを報告した。その中で本菌属分離の際の検体前処理法について検討し、低 pH あるいは加温処理後、抗生剤を加えた選択培地を併用することによって、コロニーを単離できることを示した。その結果 *Legionella* 属菌の定量的な検査が可能となったので、今回調査対象を拡げ県内のビル冷却塔水について本菌属の検出を試みた。その成績と前報〔1〕の結果をあわせて、延べ32基の冷却塔水からの *Legionella* 属菌検出状況について報告する。

## 材料および方法

## 1. 調査材料

調査地点を Fig. 1 に示した。広島市内および県南西部地域のビル（一部病院を含む）の冷却塔水を、1987年8月17日—20日に10か所24基からそれぞれ滅菌容器に1ℓ（輸送分については500 ml）採取し、同時に水温を測定した。検体はすみやかに実験室へ持ち帰り、pH を測定後本菌の分離に供した。なお、前報〔1〕の延べ8基については、図中に白丸で示した。

## 2. 分離方法

前処理の操作や同定方法等の詳細は前報〔1〕の通りで、そのアウトラインを Fig. 2 に示した。検体のうち

200—400 ml を試料として遠心後、沈渣を含む1—2 ml を採り、1試料についてそれぞれ低 pH、加温および低 pH と加温併用の前処理を行い処理別ごとに WYO 寒天培地（栄研）に塗抹して、36°C 10日間培養した。なお、低 pH 処理したものについては、BCYE 寒天培地（栄研）にも塗抹し同様に培養した。それぞれの平板に約3日後から出現した *Legionella* 属菌を疑うコロニーを釣菌し同定を行った。同定に用いた生化学的性状については、血液寒天培地上の発育、カタラーゼ活性、ゼラチン加水分解能、馬尿酸加水分解能、β-ラクタマーゼ活性、紫外線による蛍光発色の6項目である。これらの性状から同定された分離菌株について、抗血清（デンカ生研）による群別を行った。

菌数測定に当たって培養中に汚染菌の発育やコロニーが重なる等の理由で集落の計数ができなくなったものについては、4°C で保存した検体から初回の1/10量の試料について5日以内に再度検査した。

## 結 果

1987年に調査を行った24基の冷却塔水のうち20基から *Legionella* 属菌を検出し、その生菌数は Fig. 3, 4 にプロットしたように、 $6 \times 10^1$ — $1.8 \times 10^4$  CFU/100 ml を示し、個々の冷却塔の間に差がみられた。検出状況について、今回と1986年の調査成績〔1〕をあわせると、延べ32基の冷却塔のうち *Legionella* 属菌は25基から検出されたことになり、陽性率は78.1%であった。

\*広島県衛生研究所：Hiroshima Prefectural Institute of Public Health

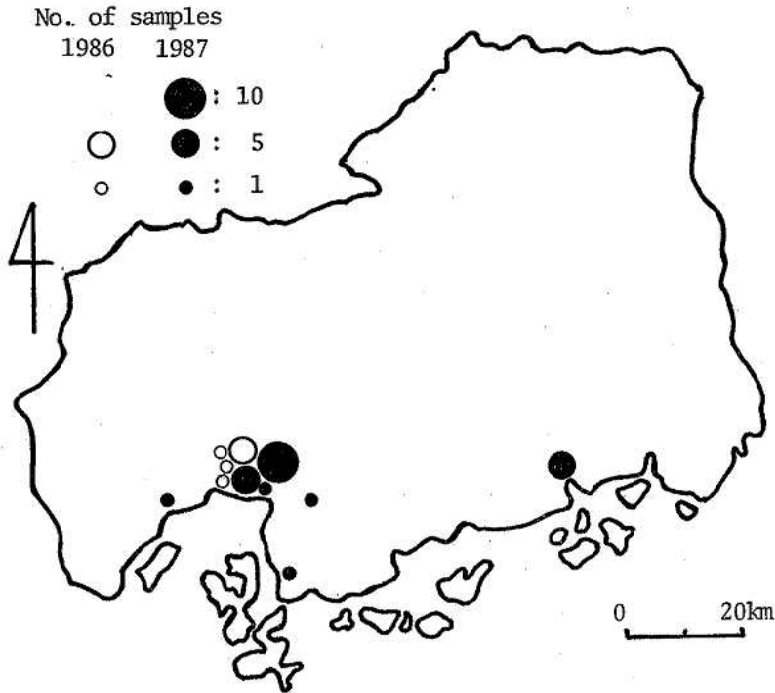


Fig. 1. Sketch map of sampling points in Hiroshima prefecture

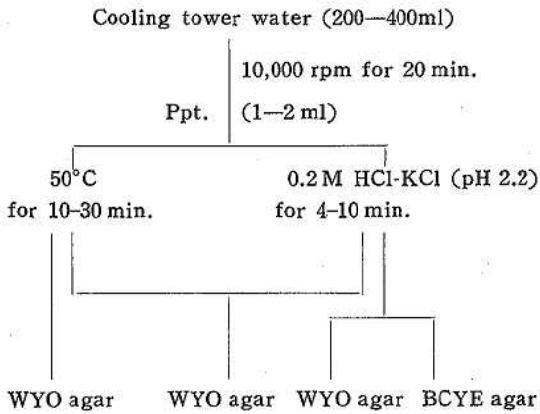


Fig. 2. Procedure for detection of *Legionella* spp. from cooling tower water

今回検出された菌株から馬尿酸水分解陰性が1株認められたが、その他の分離菌株は *L. pneumophila* の生化学的性状と一致した。これら分離菌株を *L. pneumophila* SG 1—6 の抗血清で群別すると、5基の冷却塔由来株(5株)についてはいずれにも凝集しなかったが、その他の分離菌株については、SG 1, 5, 6に群別された。上記の馬尿酸水分解陰性の *Legionella* 様菌株と *L.*

*pneumophila* 群不明菌株を岐阜大学医学部微生物学教室に同定を依頼したところ、馬尿酸水分解陰性菌株はDNA—DNA ハイブリダイゼーション法〔2〕により *L. pneumophila* と強く反応したが抗血清 SG 1—6には凝集が認められなかった。一方、群不明菌株はすべて *L. pneumophila* SG 1と同定された。以上の成績から各冷却塔から検出された菌型は Table 1 に示す通りで、菌種の内訳は *L. pneumophila* SG 1が21株、SG 5が7株、SG 6が4株および群不明が1株であった。この中には2菌型を検出したもの6基、3菌型を検出したもの

Table 1. Isolation of *Legionella* spp. from cooling tower water

Date	No. of Samples	Positive	<i>L. pneumophila</i> SG			
			1	5	6	UG*
Aug. 1986	4	2	2			
Oct. 1986	4	3	3			
Aug. 1987	24	20	16	7	4	1
Total	32	25	21	7	4	1

\*: ungroupable



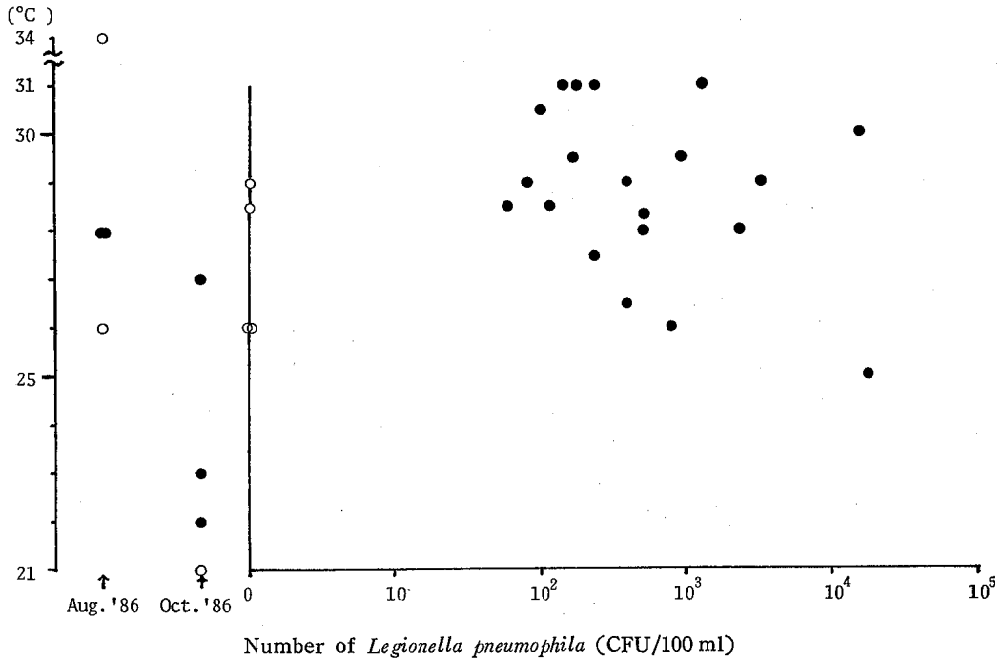


Fig. 3. Correlation of temperature of sample water and viable counts of *Legionella pneumophila*  
 ●, positive; ○, negative

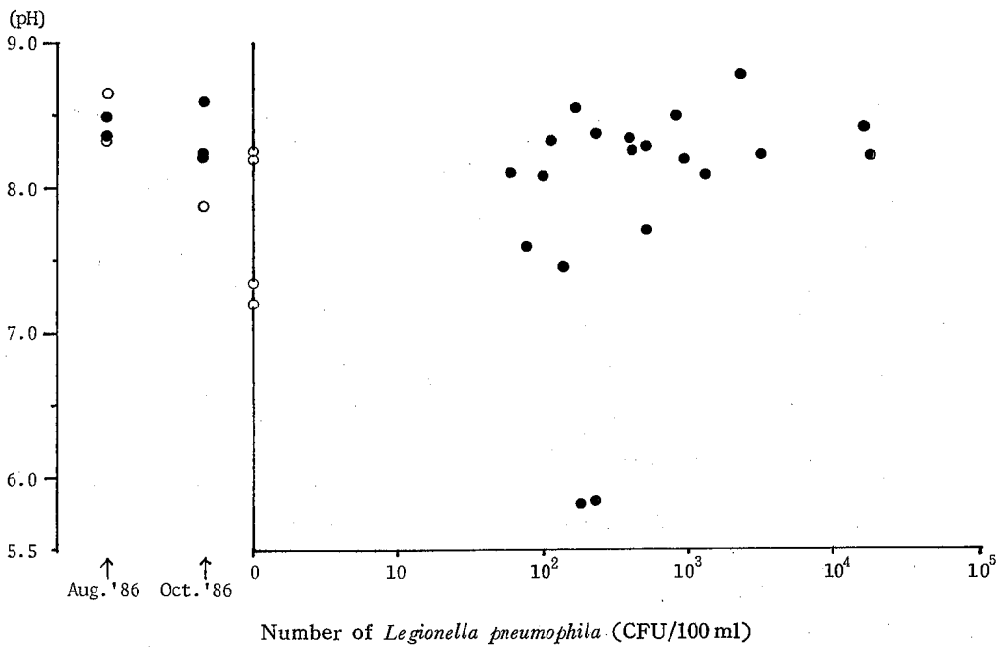


Fig. 4. Correlation of pH value of sample water and viable counts of *Legionella pneumophila*  
 ●, positive; ○, negative

1基が含まれている。

*L. pneumophila* の生菌数と水温 (Fig. 3) または pH (Fig. 4) の関係を見ると、陽性であった試料の水温は 22—31°C (平均 28.2°C), pH は 5.82—8.78 (平均 8.05) であった。水温については採取月によって差がみられるがおおむね 20—30°C の範囲にあり、pH は 8.0—8.5 の範囲にあるものが過半数を占めた。

## 考 察

*Legionella* 属菌は、河川や湖、土壌など自然界に広く生息するグラム陰性桿菌で日和見感染症の原因菌の一つとして知られている [3]。臨床的には発熱や重症の肺炎を引き起こし、特に老人の市中感染や免疫不全患者に併発する院内感染 [3, 4] が指摘されている。疫学的にはこれらレジオネラ症の感染源として我が国では空調用の冷却塔水の *Legionella* 属菌の汚染がクローズアップされ [5, 6]、その生態の究明あるいはその防除方法の開発等が急がれている [7, 8]。

今回、*Legionella* 属菌の検出された試料について WYO 寒天平板上での増殖をみると、多くは培養 5 日から 6 日目までに独立集落が出現し、10 日目までの培養ではそれ以上のコロニーの増加はほとんど認められなかった。しかし 1 試料で培養 9 日目になって突然 30 個のコロニーが出現し、最終的には 12 日目に 48 個まで増加したケースが認められたことから、7 日間の観察では稀に見落す場合があることが示唆された。

また、岐阜大学医学部微生物教室へ同定依頼した 6 菌株について、そのうちの 5 菌株は *L. pneumophila* SG 1 と同定され、群 1 抗血清の Lot. の違いを指摘された。*L. pneumophila* SG 1 にはこれまでに 5 種の抗原型が認められており [9]、著者の使用した Lot. (デンカ生研 No. 3) の群 1 抗血清にはそれら抗原型の抗血清のすべてが含まれていなかったことにより、群別ができなかったもので、後日新しい群 1 抗血清 Lot. (デンカ生研 No. 6) を用いることによって当所においても群別することができた。残る 1 菌株は、*L. pneumophila* の主な性状である馬尿酸水解が陰性であったが、本菌種と DNA—DNA 相同性が高いという同定結果から *L. pneumophila* 血清群不明 (UG) とした。SG 1—6 以外 [10—13] の血清群である可能性も考えられる。

冷却塔水中における *L. pneumophila* の生菌数と水温、pH との関係については、今回の成績 (Fig. 3, 4) からわかるように冷却塔水の水温、pH は広い範囲にわたっており、人工培地での至適培養条件 (温度 35—37°C、

pH 6.8—6.9) と比べると、環境中ではかなり厳しい条件に生息していることがうかがえる。これは、本菌属が藻類や原生動物、従属栄養細菌と共生しているためと考えられている [14]。

*Legionella* 属菌の調査は全国的に各種ビルの冷却塔水や自然環境材料について行われているが [5, 6]、病院における冷却塔水の汚染が特に注目されている。しかしながら冷却塔が本菌属によって汚染される機会は、病院もその他のビルも均等と考えられるので、今回特に病院のみを対象としないで、広島市を中心に県南西部のビルの冷却塔水について調査を行った。*Legionella* 属菌は調査した各地域の冷却塔水から高率に検出されており、その中でも *L. pneumophila* SG 1 はいずれの地域の試料からも検出されていることから県全域に分布していることが推測される。

冷却塔水に *Legionella* 属菌が一度定着すると排除することは困難なことから、特に High risk group をかかえる病院では、冷却塔の定期的な点検と衛生管理が望まれる。県内においても、患者から菌の分離や抗体価の測定を試みている病院が徐々に増えており、今後、確定診断による症例数の集積が予防対策につながるものと思われる。

## 結 語

1986, 1987年に広島県内のべ 32 基の冷却塔水の *Legionella* 属菌を調査し、以下の結果を得た。

1. 32 基中 25 基 (78.1%) の冷却塔水から *Legionella* 属菌を検出した。
2. 検出した *L. pneumophila* の生菌数は  $6 \times 10^4$ — $1.8 \times 10^6$  CFU/100 ml であった。
3. 菌検出の内訳は *L. pneumophila* SG 1 が 21 株、SG 5 が 7 株、SG 6 が 4 株、血清群不明が 1 株であった。
4. 検出菌のうち *L. pneumophila* SG 1 は県内に広く分布しているものと推察された。

おわりに、分離菌株の同定をしていただきました岐阜大学医学部微生物学教室 藪内英子教授ならびに山本啓之先生、本調査に御協力をいただきました関係各位に深謝いたします。

## 文 献

- [1] 榊美代子 (1986) : 冷却塔水からの *Legionella pneumophila* 分離状況. 広島県衛生研究所報告, 33,

- 37—40.
- [2] 江崎孝行 (1987): 新しい分類学に伴走する細菌同定法, 細菌学技術叢書 8, P. 98—113, 東京, 菜根出版.
- [3] 藪内英子 (1987): XI. *Legionella*, 医学細菌学 2 巻, P. 365—442, 東京, 菜根出版.
- [4] Arnow, P.M., Chou, T., Weil, D., Shapiro, E.N. and Kretzschmar, C. (1982): Nosocomial Legionnaires' disease caused by aerosolized tap water from respiratory devices. *J. Infect. Dis.*, 146, 460—467.
- [5] 伊藤直美 (1983): 我國全土における *Legionella* の分布調査および検出菌の病原性に関する研究. 感染症誌, 57, 682—694.
- [6] Iked, M. and Yabuuchi, E. (1986): Ecological studies of *Legionella* species. I. Viable counts of *Legionella pneumophila* in cooling tower water. *Microbiol. Immunol.*, 30, 413—423.
- [7] 藪内英子, 山本啓之 (1988): 環境感染としてのレジオネラ症とその予防. 日細菌誌, 43, 99.
- [8] 山本啓之, 杉浦 実, 藤原 守, 藪内英子 (1988): 冷却塔水の微生物と殺菌処理効果. 日細菌誌, 43, 324.
- [9] 権平文夫, 松田潤治, 曾我正男, 吉村隆二, 杉山純一, 寺田友次, 山本啓之, 藪内英子 (1988): *Legionella pneumophila* 群 1 の血清型について. 日細菌誌, 43, 865—866.
- [10] Meenhost, P.L., Reingold, A.L., Groothuis, D.G., Gorman, G.W., Wilkinson, H.W., Mckinney, R.M., Feeley, J.C., Brenner, D.J. and Van Furth, R. (1985): Water-related nosocomial pneumonia caused by *Legionella pneumophila* serogroups 1 and 10. *J. Infect. Dis.*, 152, 356—364.
- [11] Thacker, W.L., Benson, R.F., Wilkinson, H.W., Ampel, N.M., Wing, E.J., Steigerwalt, A.G. and Brenner, D.J. (1986): 11th serogroup of *Legionella pneumophila* isolated from a patient with fatal pneumonia. *J. Clin. Microbiol.*, 23, 1146—1147.
- [12] Thacker, W.L., Wilkinson, H.W., Benson, R.F. and Brenner, D.J. (1987): *Legionella pneumophila* serogroup 12 isolated from human and environmental sources. *J. Clin. Microbiol.*, 25, 569—570.
- [13] Lindquist, D. S., Nygaard, G., Thacker, W.L., Benson, R.F., Brenner, D.J. and Wilkinson, H.W. (1988): 13th serogroup of *Legionella pneumophila* isolated from patients with pneumonia. *J. Clin. Microbiol.*, 26, 586—587.
- [14] 山本啓之 (1987): 日本生命財団シンポジウム「レジオネラ症の予防」.

## 1987年広島県内で流行した手足口病について

高尾 信一\* 妹尾 正登\* 武井 直巳\*

A Study of Hand, Foot and Mouth Disease  
Prevailed in Hiroshima Prefecture in 1987SHINICHI TAKAO\*, MASATO SENO\*  
AND NAOMI TAKEI\*

(Received Oct. 31, 1988)

## はじめに

手足口病は、主に夏季を中心に流行する、手、足、口腔内の小水疱形成を主徴とした小児の発疹性疾患で、コクサッキーウイルスA16型 (C A16) とエンテロウイルス71型 (E V71) が本症の主な病原体となっている〔1〕。

われわれは、広島県結核・感染症サーベイランス事業 (サーベイランス) に基づいて検査対象疾病からの病原検索を実施しているが、手足口病についても対象疾病の一つとして、その患者発生状況の把握と共に定点病院を通じて患者からのウイルス分離を行っている。例年本県における手足口病の流行は、その規模は別としておおむね夏季を中心に認められていたが、1987年の手足口病は患者の発生が従来の夏季を中心としたものではなく、秋季の11月を中心として認められた。流行期間中、手足口病患者からは42株のC A16と1株のE V71が分離され、本流行が主としてC A16によるものであることが推測されたが、この分離C A16についてウイルス学的検討を行ったところ、C A16標準株とは若干の抗原的な違いを示唆する所見が得られたので、それらの成績も合わせて、1987年に本県で流行した手足口病について報告する。

## 材料及び方法

## 1. 手足口病患者発生状況

広島県感染症情報〔2〕を基に集計した。

## 2. ウイルスの分離・同定

## (1) 分離材料

1987年4月から1988年3月までの間に、県内のサーベイランス定点病院において手足口病と診断されて、検体の採取された患者47人からの咽頭ぬぐい液46、便1、水疱内容1、計48検体を対象として、これらからのウイルス分離を行った。

## (2) ウイルス分離

分離のための細胞としては、BGM、HEp 2、RD-18S、LLC-MK<sub>2</sub>、Vero、HeLaを用い、それぞれの細胞を24穴プレートに単層培養し、1検体当たり2～4穴に処理検体を0.2mlずつ接種して、34°C CO<sub>2</sub>ふ卵器中で静置培養した。細胞変性効果 (CPE) を指標として6日間観察し、3代の盲継代後においてもCPEが現れなかったものについては分離陰性とした。

## (3) C A16及びE V71の同定

分離ウイルスの同定には当所で作成した抗C A16及び抗E V71家兔血清を用い、CPEを指標としたマイクロ法による中和試験で同定した〔3〕。なお、抗C A16血清については、抗標準株血清と1971年当所で分離した分離株に対する抗血清の2種類を用いた。

## 3. C A16ブラック形成

HEp 2 及び Vero 細胞を用いて、C A16 標準株 (標準株) (MK<sub>2</sub>細胞で数代、HEp 2 細胞で1代継代) と1987年11月に手足口病患者から分離されたC A16分離株 (分

\* 広島県衛生研究所 : Hiroshima Prefectural Institute of Public Health

離株)(HEp2細胞で4代継代)の2株のウイルスについて、それぞれの細胞におけるブラック形状を検討した。すなわち、35mmプラスチックシャーレに単層培養したHEp2及びVero細胞に、標準株あるいは分離株をそれぞれ接種して、37°C 60分間吸着させた後に、1.5% methyl cellulose (4,000 cps)を含む維持培地2mlを重層して、37°C 3日間培養した。この後0.5% Crystal Violet—50% Ethanolで固定・染色してブラック形状を比較した。

4. CA16血清中和抗体価

サーベイランス定点病院において1985年7月から1988年2月の間に採取された、0歳から19歳までの手足口病とは直接関係の無いと思われる患者血清(被検血清)24件を用いて、標準株及び分離株のそれぞれに対する中和抗体価をHEp2細胞を用いた50%ブラック減少法によって測定した。すなわち、それぞれ100 TCID<sub>50</sub>のウイルスと2倍階段希釈した非働化血清とを等量混合し、37°C 120分間中和した後に、35mmプラスチックシャーレに単層培養したHEp2細胞に接種して、ブラック形成のところで述べた方法に準じて、1.5% methyl cellulose 加培地重層3日目のブラック数を数えた。ブラック減少率が50%以下を示した血清最大希釈倍数をもって中和抗体価とし、8倍以上を陽性として取り扱った。

結 果

1. 手足口病患者の月別発生状況及びウイルス分離成績

1987年4月から1988年3月までの本県における月別の手足口病患者発生数を広島県感染症情報を基に集計した。そして、これらの患者のうちで、当所においてウイルス分離を実施した月別検体数と、それらからのCA16及びEV71の分離成績を合せて図1に示した。

患者発生状況については、例年患者発生のピークを示す6~7月〔4〕を過ぎても患者数は増え続け、11月には850名を数えピークを示し、それ以後は急激に減少したが、患者の発生は1988年3月まで続いた。

ウイルス分離の対象となった48件の患者検体からは、9月にEV71が1株分離されたものの、それ以外の42件

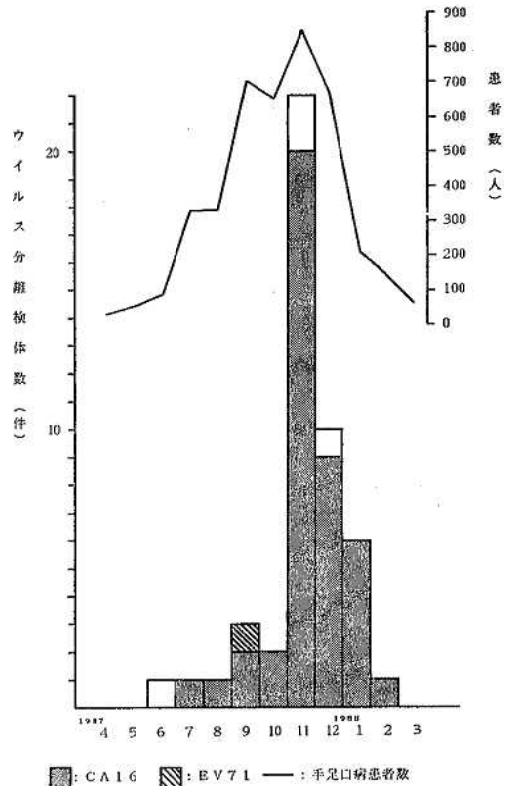


図1 手足口病患者の月別発生状況及びウイルス分離成績

からはすべてCA16が分離され、今回の手足口病の流行はCA16が主な原因ウイルスであったと推察された。

分離されたCA16の同定に際しては、最初抗標準株血清で同定を試みたところ、分離ウイルスに対する中和能が弱く、CA16と同定するまでには至らなかった。そこで1971年の本県流行例から分離されたCA16に対する抗血清を用いて再度同定を試みたところ、この抗血清に対しては容易に中和されCA16と同定された。

2. CA16の培養細胞別分離成績

今回分離されたCA16の培養細胞別ウイルス分離成績を表1に示した。培養細胞はBGM, HEp2, RD-

表1 CA16の培養細胞別分離成績

CA16分離株数	培養細胞別分離株数(%)					
	Vero	LLC-MK <sub>2</sub>	HEp2	HeLa	BGM	RD-18S
42	40(95)	23(55)	18(43)	2(5)	0(0)	0(0)

18S, Vero, HeLa, LLC-MK<sub>2</sub>を全例に使用した。分離されたC A16 42株のうち、Vero で40株 (95%) と最も高率に分離され、次いで LLC-MK<sub>2</sub> 23株 (55%), HEp 2 18株 (43%)と続き、HeLa でもわずかに分離されたが、BGM及びRD-18S では全く分離されず、細胞の種類によって著しい感受性の違いが認められた。なお、分離率の高かった Vero と LLC-MK<sub>2</sub> との成績を合せると42株の全例がこれら細胞のいずれか、あるいは両方で分離されている。

### 3. C A16標準株及び分離株の HEp 2 及び Vero 細胞におけるブラック形状

今回分離されたC A16は抗標準株血清に対しては中和

され難く、ウイルス学的性状に違いのある可能性が示唆されたので、標準株と分離株とについて、HEp 2 及び Vero 細胞におけるブラック形状を比較し、図2に示した。HEp 2 細胞では標準株、分離株ともに直径0.5~1.0 mmの明瞭なブラックを形成した。一方 Vero 細胞では標準株のブラックはピンホール大あるいはそれ以下で不明瞭であったが、分離株のそれは、直径1.0~2.0 mmの大きなブラックを形成し、標準株と分離株とでは Vero 細胞においてブラック形成能に違いが認められた。

### 4. C A16標準株及び分離株に対する血清中和抗体価の比較

標準株と分離株とのウイルス学的な違いを更に検討す

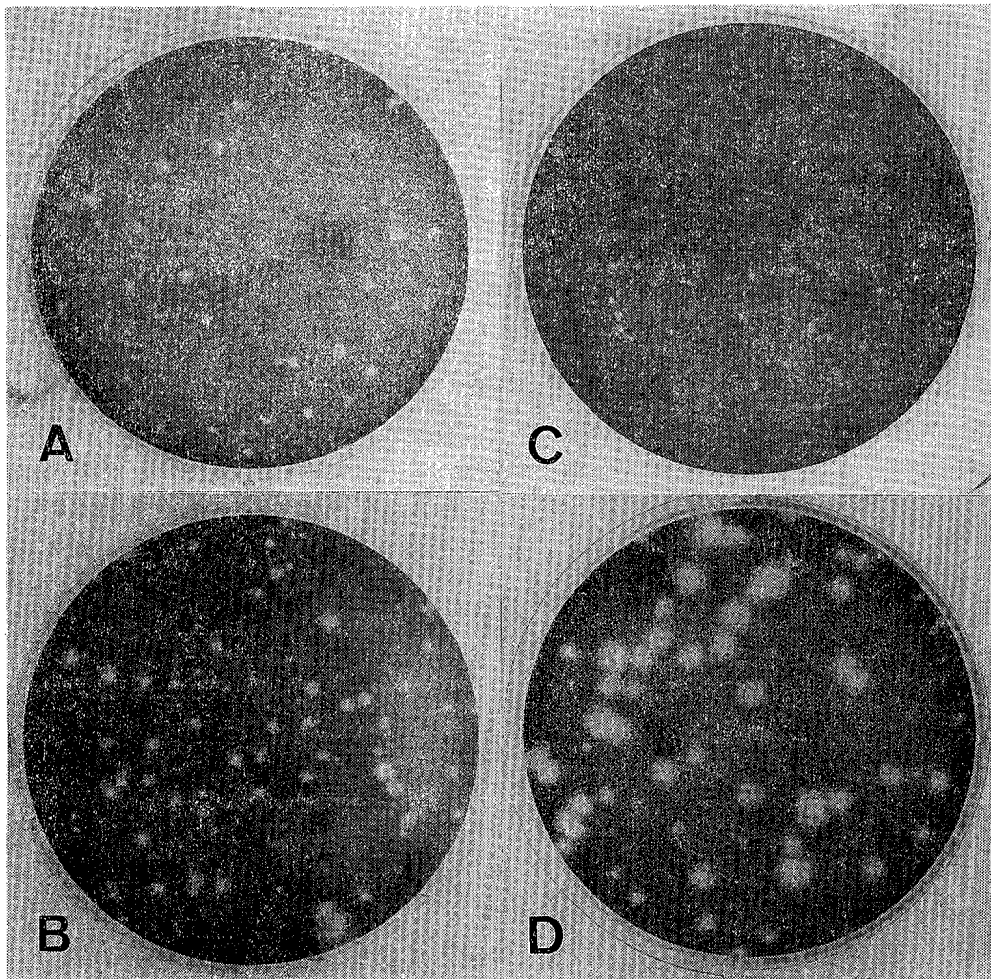


図2 C A16標準株及び分離株の HEp2, Vero 細胞におけるブラック形状

A : HEp 2 細胞感染標準株    C : Vero 細胞感染標準株  
B : HEp 2 細胞感染分離株    D : Vero 細胞感染分離株

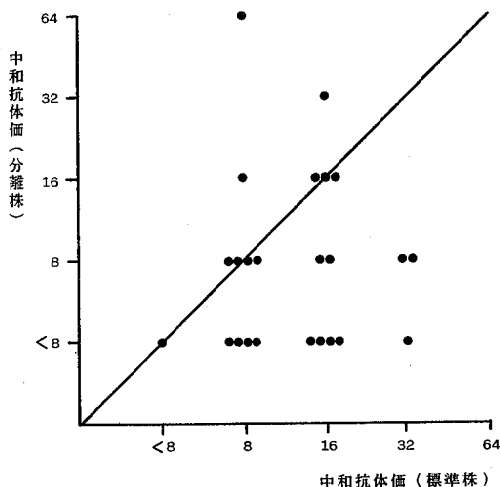


図3 C A16標準株及び分離株に対する血清中和抗体価

るために、被検血清24件を用いてそれらが保有している標準株及び分離株に対する中和抗体価をそれぞれに測定し、その成績を図3に示した。被検血清は標準株に対しては96% (23/24) が抗体陽性を示したが、分離株に対しては58% (14/24) が陽性を示したに過ぎなかった。また保有抗体価についても、分離株に対する抗体価が標準株に対するよりも高い価を示したのは3例のみで、残りはすべて同じ抗体価か、あるいは標準株に対する抗体価の方が高い価を示した。

### 考 察

手足口病は夏季の流行病として、例年全国的に6~7月を中心に患者が多発するのが一般的で、本県においても、これまでそれと同様の発生状況がみられていた〔4〕が、1987年の流行は、例年とは異なり、夏を過ぎても患者の発生は増え続け、11月がピークとなった。今回のこの様な現象は本県だけにみられたものではなく、病原微生物検出情報〔5〕の全国集計結果でも、全国的に同様の傾向であったことがうかがわれる。上記検出情報によると1987年の手足口病は、まず6~7月にE V71による流行があり、これに引き続いて11月をピークとしたC A16による流行があったことが示されている〔5〕。飯塚ら〔6〕は、過去における手足口病の流行の際にC A16及びE V71の両者が関与した年や、他のエンテロウイルスが同時に流行した年には、手足口病の流行が夏のみで終わらず秋になっても多くの患者発生が認められたと報告して

いる。これは手足口病の流行時期が、他のエンテロウイルスの流行に影響されたためと考察していることから、今回の手足口病の流行においても、最初に流行したE V71が後のC A16の流行に影響を与えたために、秋にまで患者発生がずれこんでしまったとも考えられる。本県においては1983年にE V71による大きな手足口病の流行をみているが〔4〕、今回の流行は患者発生数等からみて翌1984年のC A16による流行〔4〕とほぼ同規模の流行であったものと推察される。

今回ウイルス分離を実施した47名の手足口病患者からは、42株のC A16と1株のE V71が分離されたことから、本県における今回の手足口病は、一部E V71が関与していたものの、その主流はC A16によるものと考えられた。E V71については、手足口病だけでなく、無菌性髄膜炎の原因ウイルスとなることが知られており〔7-9〕、1987年には、本県でも無菌性髄膜炎患者からE V71が3株分離されている〔10〕ことから、E V71は手足口病だけでなく無菌性髄膜炎の原因ウイルスとしても流行していたことが推察される。

今回流行したC A16について若干のウイルス学的検討を行った結果についてみると、分離ウイルスの同定に際して、分離株は抗標準株血清に対しては中和され難く、1971年分離のC A16に対する抗血清ではよく中和され同定が可能であった。この点については直ちに今回のC A16と標準株との抗原的な違いに関連するものかどうか、更に詳細な検討が必要と思われるが、エンテロウイルスについては分離株が高単位の抗標準血清で中和され難いものに対して、抗分離株血清がその分離株と同様に標準株をもよく中和するようなプライム株 (prime strain) の存在が数多くの血清型で知られている〔11〕。今回の分離株についても、抗標準株血清では中和され難かったことからその可能性も考えられ、Vero細胞で認められた標準株と分離株とのブラック形状の違いもこれに関連するものかも知れない。今後この分離株に対する抗血清を作成し、今回の分離株がプライム株に相当するものかについての検討が必要と考えている。

被検血清における標準株と分離株それぞれに対する保有抗体価の比較では、標準株に対しては96%が抗体陽性を示したのに対し、分離株に対しては58%が陽性であったにすぎず、また抗体価も総じて低かった。この点については同定の際の成績からすれば、被検血清中の抗体価は標準株に対してよりむしろ分離株に対しより高いことが期待されるが、今回の分離株が標準株に対してのみならず、1987年以前の流行株とも若干の違い、あるいは回

帰のある可能性もあり、これは1971年以降の各年の分離株について総合的に検討されることによって明らかにされるものと考えている。

### ま と め

1987年4月から1988年3月までの間に広島県内で流行した手足口病について検討した。

1. 1987年の手足口病の流行は、従来の夏季を中心とした発生ではなく、秋季の11月をピークとして患者発生が認められた。

2. 手足口病患者由来の検体48件からはE V71が1株と、C A16が42株分離され、C A16が主な原因ウイルスと推察された。

3. C A16の分離に際しては、Vero 細胞で最も高率(96%)に分離された。

4. 今回のC A16分離株は、抗標準株血清では中和され難い点、Vero 細胞におけるブラック形成能に標準株とは違いが認められる点、標準株と分離株に対するそれぞれのC A16血清中和抗体価に差が認められる点などから、標準株とは若干の抗原変異の可能性が示唆された。

### 文 献

[1] 渡辺悌吉 (1985) : 手足口病. 臨床とウイルス, 13(1), 31—35.  
[2] 広島県環境保健部(1988) : 広島県感染症情報 週

報, 第15週. P. 17.

[3] 多ヶ谷勇, 原 稔 (1982) : ウイルス実験学各論. P. 127—155, 国立予防衛生研究所学会編, 東京, 丸善.  
[4] 広島県環境保健部 (1987) : 広島県感染症サーベイランス事業報告書, 第4報. P. 53—55.  
[5] 国立予防衛生研究所・厚生省保健医療局結核難病感染症課感染症対策室 (1988) : <特集>手足口病の冬季流行. 病原微生物検出情報 月報, 97, 1—20.  
[6] 飯塚節子, 板垣朝夫 (1988) : 1978年から1985年間に流行した手足口病について. 臨床とウイルス, 16(1), 54—58.  
[7] 荻原昭夫 (1979) : エンテロウイルス71型. 臨床とウイルス, 7(1), 20—24.  
[8] 西野泰生 (1988) : エンテロウイルス71感染症. 臨床とウイルス, 16(1), 48—53.  
[9] 高見俊才, 大瀬戸光明, 小笠原光憲, 矢野 朱, 森 正俊, 山岡邦夫, 曾用研二, 石丸啓郎, 西林洋平, 徳丸 実 (1979) : エンテロウイルス71型によるHFMD. 臨床とウイルス, 7(1), 104—108.  
[10] 広島県衛生研究所 (1988) : 感染症サーベイランス. 広島県衛生研究所業務年報, 22, 16—17.  
[11] 植竹久雄編(1987) : ウイルス学 第3版. P. 409—429, 東京, 理工学社.



## 神経芽細胞腫のマス・スクリーニングについて (第2報)

—ろ紙尿のクレアチニン低値とVMA, HVA値に関する考察—

水田 満里\* 瀬川 和幸\* 海佐 裕幸\*

### Mass Screening of Neuroblastoma —Corelation of VMA and HVA Values with the Levelsof Creatinine in Urine—

MARI MIZUTA, KAZUYUKI SEGAWA AND HIROYUKI UMISA

(Received Nov. 7, 1988)

#### はじめに

乳幼児を対象とした神経芽細胞腫のマス・スクリーニングが、厚生省の事業として、昭和60年1月から開始されて約3年半が経過した。

神経芽細胞腫は、カテコールアミン産生腫瘍であるため、患児の尿中には、これらの代謝物であるバニルマンデル酸 (VMA) やホモバニリン酸 (HVA) が多量に排出されるので、これらを指標にして、本症のマス・スクリーニングをおこなっている [1]。

検査材料は、母親が採尿して送ってくるろ紙尿であり、その際、尿をしみ込ませたろ紙を乾かさないうで送る方法 (wet) と、乾燥させて送る方法 (dry) の2種類がある。

広島県では、昭和60年度は、wet法を採用したが、細菌汚染によるろ紙尿の変質による問題点が判明したので [3, 7], 昭和61年度から dry法に変更した。

マス・スクリーニングの方法は、一次検査で、尿中のVMAの定性検査であるDIP法をおこない、二次検査で、尿中のVMA, HVAを高速液体クロマトグラフィ (HPLC) で定量している。その際、VMA, HVAが尿中に増量しているか否かを判定するために、尿中のクレアチニンで補正したVMA, HVA値を使用している。

しかしながら、クレアチニンが低い値の検体は、患者ではないのに異常値を示す事が多く、その取り扱いについては検査機関で苦慮している場合が多い。今回、wet法と dry法の2種類のろ紙尿によるスクリーニングを経験する機会を得たので、クレアチニン低値の検体のVMA, HVAについて考察をおこなった。

#### 材料および方法

##### 1 検体

ろ紙尿：ろ紙 (東洋ろ紙No.63 1.5×5 cm) をオムツの間に挟み、尿をしみ込ませたもの。

##### 2 ろ紙尿の前処理

湿ったろ紙：注射筒で絞りだした。生乾きや尿量が少なく絞りとれなかったものは蒸留水を湿潤するまで滴下して、その後、絞りだした。

乾いたろ紙：ろ紙一枚に0.7 mlの尿がしみ込むので、蒸留水を0.7 ml滴下して注射筒で押しだした。

##### 3 測定項目および測定方法

VMA, HVA : HPLCによる定量。

クレアチニン : Jaffeの反応に基づくFollin-Wu法 [2]

HPLCによるVMA, HVAの測定のための前処理方法、およびクレアチニンの測定方法は、厚生省の神経芽

\* 広島県衛生研究所 : Hiroshima Prefectural Institute of Public Health

細胞腫マスクリーニング研究班の精度管理標準測定法

(案)に従った〔2〕。

4 HPLC 測定条件

カラム: Yanapak ODS-A(4.6mmφ×250mm).  
 移動相: 0.02Mりん酸-カリウム溶液(pH 3.1  
 0.05mM EDTA2Naを含む):メ  
 タノール=(80:20).

流量: 1.0ml/分.

カラム温度: 室温.

設定加電圧: +800mV v.s Ag/AgCl.

注入量: 10μl.

検出器: ヤナコVMD-501.

ポンプ: 東洋ソーダ CCPD.

結果および考察

正常の乳幼児では、尿中のVMA, HVA量はクレアチニン量に比例しており〔5〕, クレアチニン量で補正したVMA, HVA値は、正規性の分布をする〔3-6〕. 患者の発見のためには、クレアチニンで補正したVMA, HVA値の平均値に2.5倍の標準偏差(SD)を加えた値をカットオフ値として、異常値の判定に使用している。

したがって、カットオフ値は、検査機関によって異なり、かつ、固定的なものではないが、一般的に、VMA, HVAの平均値は、それぞれ10μg/mgクレアチニン, 16μg/mgクレアチニン前後で、カットオフ値はそれぞれ20μg/mgクレアチニン, 30μg/mgクレアチニン(以下、異

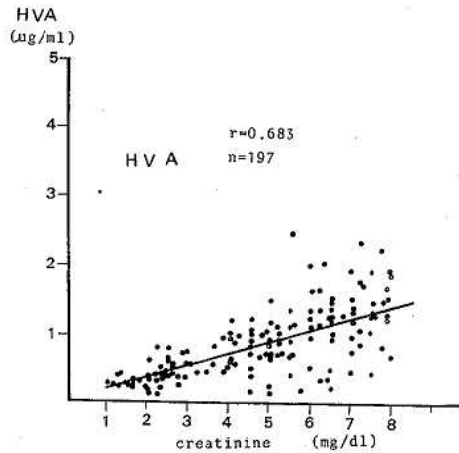
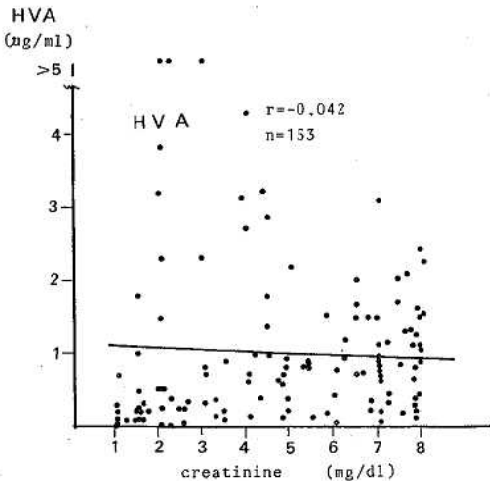
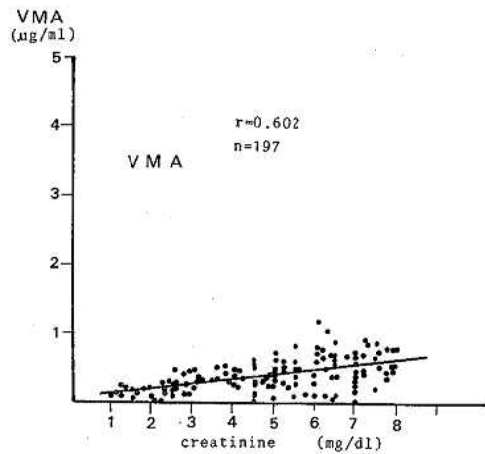
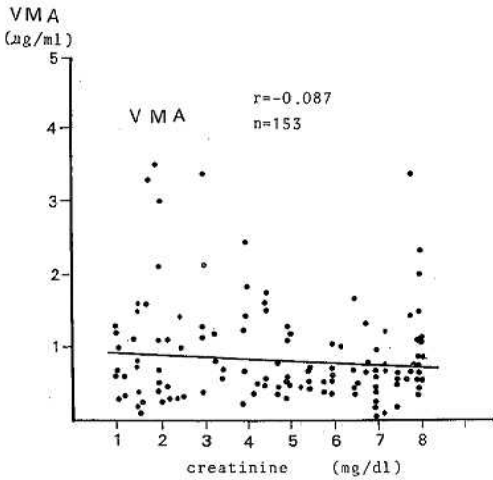


図1 湿ったる紙尿におけるクレアチニン量とVMA, HVA量の相関

図2 乾いたる紙尿におけるクレアチニン量とVMA, HVA量の相関

常値とする)前後である[3-6].

ろ紙尿中のクレアチニン値については、すでに報告しているように、定量限界以下 ( $0.1 \text{ mg/dl}$ ) のものから、最大値  $170 \text{ mg/dl}$  のものまであり、その平均値は、 $25.7 \text{ mg/dl}$ 、標準偏差が  $23.6 \text{ mg/dl}$  と幅広い分布を示す[3].

ろ紙尿におけるこのような変動は、濃縮された状態の濃い尿から、水分等のとりすぎによって薄くなった尿まで、いろいろな尿があることに加えて、ろ紙に含まれる尿量もまちまちであることを反映している。

クレアチニンが  $8 \text{ mg/dl}$  以下を、クレアチニンが低値の検体(以下、低クレアチニン検体)とみなし、VMA、HVA値を検討した。

## 1. 低クレアチニン検体のクレアチニン量とVMA、HVA量の相関について

### (1) 湿ったろ紙について (図1)

クレアチニン量とVMA、HVA量との間に、相関関係はみられない。このことは、クレアチニン量に比して低値、高値のVMA、HVAが含まれているためと考えられる。

### (2) 乾いたろ紙について (図2)

クレアチニン量とVMA、HVA量との間に、相関関係がみられた。

## 2. 低クレアチニン検体のクレアチニン補正したVMA、HVA値の100分率のヒストグラムについて

低クレアチニン検体を、クレアチニンが  $1-3 \text{ mg/dl}$ 、 $3-5 \text{ mg/dl}$ 、 $5-8 \text{ mg/dl}$  の3つのグループに分け、それぞれのグループごとに、クレアチニン補正値のVMA、HVA値の百分率についてヒストグラムを作成し、ろ紙尿の乾湿による違いを検討した(図3, 4, 5)。

### (1) クレアチニン $1-3 \text{ mg/dl}$ について (図3)

湿ったろ紙尿では、VMA、HVA値が  $50 \mu\text{g/mg}$  クレアチニン以上の異常高値を示したものが、それぞれ50%、27.5%あった。一方、HVA値は、 $5 \mu\text{g/mg}$  クレアチニン以下の低値を示したものが12.5%あり、VMA、HVA値ともに従来の正規性をもつ分布のパターンとは大きく異なっている。

一方、乾いたろ紙尿では、VMA、HVAとも異常高値を示すものはみられず、正常な分布型を示した。

### (2) クレアチニン $3-5 \text{ mg/dl}$ について (図4)

湿ったろ紙尿では、VMA、HVA値が  $50 \mu\text{g/mg}$  クレアチニン以上の異常高値を示したものは、それぞれ16.7%、29%であった。一方、HVA値が、 $5 \mu\text{g/mg}$  クレアチニン以下の低値を示したものは15%であった。

乾いたろ紙尿では、VMA、HVAともそれぞれ異常高値を示すものはみられなかった。

### (3) クレアチニン $5-8 \text{ mg/dl}$ について (図5)

湿ったろ紙尿でも、VMA、HVA値が  $50 \mu\text{g/mg}$  クレアチニン以上の異常高値を示したものはみられなかった。HVAは  $5 \mu\text{g/mg}$  クレアチニン以下の低値を示したものが21%であった。

低クレアチニン検体で異常値を示したもののなかで、再検査ができたものは、すべてが正常と判定された。

一般的に、VMAが  $50 \mu\text{g/mg}$  クレアチニン以上の異常高値を示すものは、患者である場合がほとんどであるが、湿ったろ紙尿の低クレアチニン検体では、患者ではないと思われるのに、異常な高値を示すものが多く、その割合はクレアチニンが低いもの程高くなっている。同様な傾向はHVAにおいてもみられる。

これらの原因として、尿が排出された時点では、VMA、HVA量に相当するだけのクレアチニン量があったものと思われるが、ろ紙尿中で、クレアチニンが分解した場合は、クレアチニン補正をすることによって、異常高値となることが考えられる(図3)。

一方、乾いたろ紙尿では、異常値の割合も低く、異常高値がほとんど見られない。

著者らは、湿ったろ紙尿では、日数が経過するにつれて尿が腐敗し、クレアチニンやVMA、HVAが低下することを報告した[7]。これらの低下の程度は細菌の種類によって異なるが、とくに、クレアチニンとHVAの低下が顕著であること、これに反して、乾いたろ紙尿では、尿の腐敗は起きず、クレアチニンやVMA、HVAが安定していること等を、実験的に証明した[7]。

今回の、湿ったろ紙尿で、クレアチニンが分解したために補正の誤差で異常高値がでやすいことや、HVAの分解が懸念されるものが多いこと、一方、乾いたろ紙尿ではそのようなことがないこと等が、すでに報告した内容[7]とよく一致した。

ろ紙尿でクレアチニンが低値となる原因は、尿が薄い、吸着尿量が少ない、クレアチニンが分解していること等が、主に考えられるが、その中で、湿ったろ紙尿でクレアチニンが  $5 \text{ mg/dl}$  以下のものには、クレアチニンが分解しているものが含まれている可能性が高い(図1, 3, 4)。

一方、乾いたろ紙尿では、薄い尿がついている場合とろ紙についている尿量が少ない場合がほとんどであることが推定される。このような場合は、クレアチニン量と

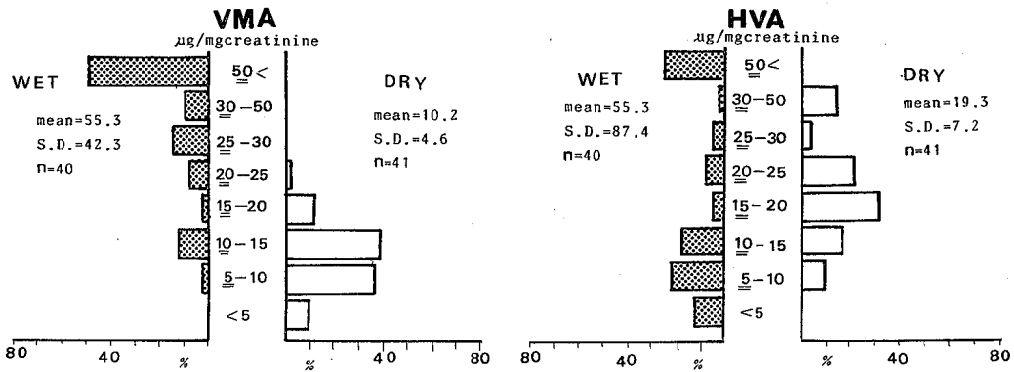


図3 クレアチニン値 1—3 mg/dl 検体の湿ったろ紙尿および乾いたろ紙尿のVMA, HVA値の分布

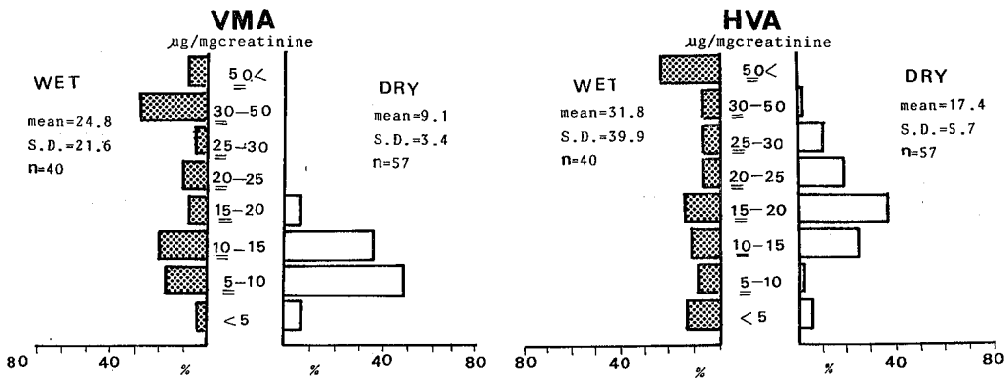


図4 クレアチニン値 3—5 mg/dl 検体の湿ったろ紙尿および乾いたろ紙尿の値VMA, HVA値の分布

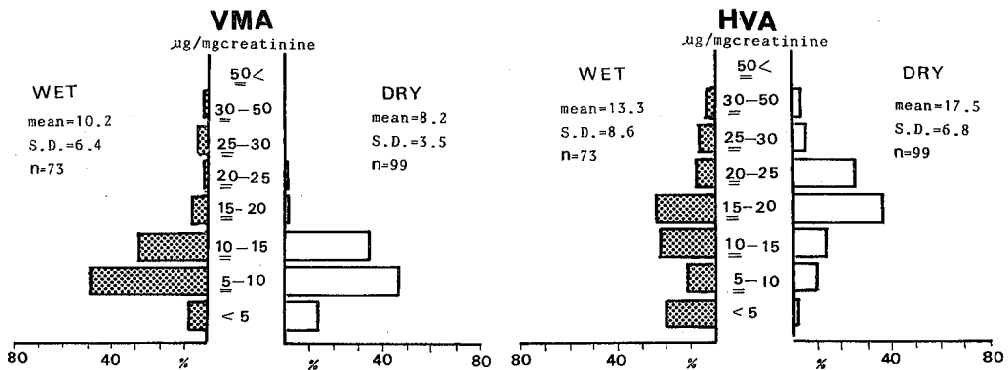


図5 クレアチニン値 5—8 mg/dl 検体の湿ったろ紙尿および乾いたろ紙尿のVMA, HVA値の分布

VMA, HVA量は、比例関係にあるため正常値となる(図2, 3, 4, 5).

しかしながら、乾いたろ紙尿の中にも、ろ紙を一晩おしめにあてている間に腐敗していることもありうるが、今回のデータからは、その割合は少ないものと推定された。

マス・スクリーニングではVMA, HVAの平均値+2.5SDをカットオフ値とするため、変動要因を少なくすることが、スクリーニングの精度管理上極めて重要である。

最近、マス・スクリーニングの検体として、wet法はふさわしくないとの見解がだされたが〔8, 9〕, dry法であっても生乾きのろ紙も送付されてくるので、そのような検体の取り扱いについてはとくに注意が必要である。

#### ま と め

1. クレアチニンが5mg/dl以下の湿ったろ紙尿では、クレアチニンが分解しているものが含まれている可能性が高い。
2. クレアチニンが3mg/dl以下の湿ったろ紙尿では、クレアチニンの分解による補正の誤差で、VMA, HVAが異常高値を示すものが多い。
3. 湿ったろ紙尿では、HVAの低値のものが多い。

4. 乾いたろ紙尿では、クレアチニンが低値でもクレアチニン補正值により、VMA, HVAは正常値を示す。

#### 文 献

- 〔1〕 母子愛育会編(1984): 神経芽細胞腫マススクリーニング, P. 103—108. 東京, 大門出版.
- 〔2〕 厚生省神経芽細胞腫マススクリーニング研究班(1985): 資料.
- 〔3〕 水田満里, 海佐裕幸(1986): 広島県衛研報告, 33, 41—44.
- 〔4〕 花井潤師, 辻 慶子, 田口 武, 落合玲子, 佐藤英里子, 佐藤康昌, 前田博之, 青木 穰, 林 英夫, 高杉信男, 武田武夫: 札幌市衛研年報(1984): 11, 41—47.
- 〔5〕 佐藤康昌, 福土 勝, 高杉信男, 武田武夫(1985): 日本小児科学会誌, 89, 2665—2671.
- 〔6〕 今井準三, 田中久子, 坂井至通, 森下有輝(1987): 岐阜衛研所報, 32, 34—37.
- 〔7〕 水田満里, 海佐裕幸(1988): 日本公衛誌, 35, 179—183.
- 〔8〕 沢田 淳(1988): 日本医事新報, 3550, 29—31.
- 〔9〕 厚生省児童家庭局(1988): 児母衛15号参考資料.

## 広島県の鉱泉水質組成の検討

中村 寿夫\* 中富 美津江\*

Chemical Characteristics of Mineral Springs  
in Hiroshima Prefecture

KAZUO NAKAMURA AND MITSUE NAKATOMI

(Received Oct. 24, 1988)

## 緒 言

県内の鉱泉はそのほとんどが低温の放射能泉である。それらの水質の特徴については、調枝により主に地球化学的立場から検討されている〔1〕。鉱泉の現状を把握することは鉱泉の乱開発及び過剰汲み上げによる水質変化、枯渇等を防止して適正な鉱泉開発を進めていく上で意義深いものと考えられる。

そこで昭和31年度から61年度までに当衛生研究所で実施した鉱泉分析の結果をもとに、調枝による検討結果をふまえた上で鉱泉水成分の濃度及び主要成分相互の関係について検討したので報告する。

## 試料及び方法

## 1. 試料及び試験方法

昭和31年度から61年度までに鉱泉分析法指針等〔3—4〕に基づき当所で実施した87鉱泉の中分析結果のうち、泉温、蒸発残渣、ラドン、 $K^+$ 、 $Na^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Cl^-$ 、 $HCO_3^-$ 、 $SO_4^{2-}$ 及びケイ酸の分析結果を使用して統計解析を行った。

## 2. 統計解析

ラドンと花崗岩の種類の関係及びラドンと陰イオンの型の関係についての検討は平均値の差の検定(両側検定; 母平均及び母分散共に未知の場合)により行い、泉

温を除いた他の10項目間の相関関係は直線回帰分析により検討した。

## 鉱泉湧出地の概況

県内に湧出する鉱泉は図1に示したとおり90近くあるが、調枝は、これらの分布する場所を、その水質をもとに4地域に分けている〔1〕。すなわち佐伯郡佐伯町から山県郡千代田町にかけての県北西部地域(以下A地域と称する)、広島市周辺、呉市及び竹原市地域(以下B地域と称する)、尾道市から福山市にかけての県南東部地域(以下C地域と称する)、世羅郡甲山町から比婆郡高野町にかけての県北部を中心とする地域(以下D地域と称する)である。地質は、いずれの地域も花崗岩が分布しており〔2〕、鉱泉水は多くの場合ラドンを含有している。

## 鉱泉水主要成分の分析結果及び考察

図1に示した鉱泉のうち87鉱泉の主要成分について下記のような検討を行った。

## 1. 泉温

県内には高温の温泉は存在せず、A及びD地域に25°C以上の低温泉に該当するものが6(鉱泉No. 9, 10, 13, 15, 77, 81)あるだけであり、B及びC地域には25°Cに近い泉温のものは存在しない。中国地方の火山帯は山

\* 広島県衛生研究所: Hiroshima Prefectural Institute of Public Health

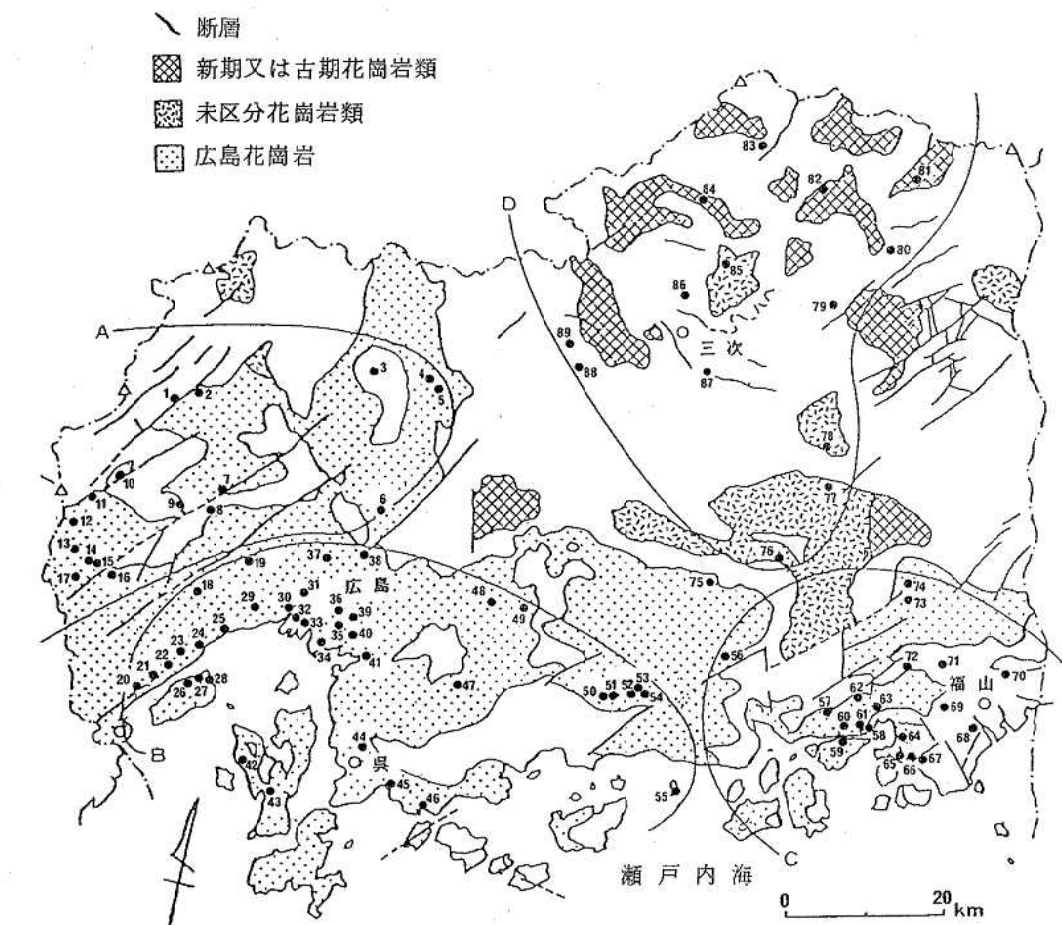


図1 広島県の鉱泉及び花崗岩の分布

- |               |             |                      |             |             |
|---------------|-------------|----------------------|-------------|-------------|
| 1 三段峡温泉       | 21 宮浜温泉     | 41 道祖園               | 61 レイクホテル   | 81 比婆山温泉熊の湯 |
| 2 弁才天湯        | 22 玉出温泉     | 42 相和温泉              | 62 養老温泉(尾道) | 82 比和温泉     |
| 3 豊平温泉        | 23 チチヤスホワイト | 43 お湯温泉(1, 2)        | 63 松永本郷温泉   | 83 荒川昇早     |
| 4 千代田温泉(1, 2) | 23 温泉       | 44 深山温泉              | 64 松永温泉     | 84 沓ヶ原温泉    |
| 5 養老温泉(千代田)   | 24 阿品土屋病院泉源 | 45 宇田 誠              | 65 懐ヶ浜ラドン温泉 | 85 高茂温泉     |
| 6 可部温泉        | 25 宮内温泉     | 46 小磯温泉              | 66 西福寺温泉    | 86 三次温泉     |
| 7 湯の山温泉       | 26 宮島温泉     | 47 黒瀬温泉              | 67 みろくの里    | 87 塩町温泉     |
| 8 湯来伏谷温泉      | 27 大元温泉     | 48 水城 初              | 68 三谷温泉     | 88 高宮温泉永楽荘  |
| 9 湯来温泉        | 28 杉の浦湯元    | 49 西条温泉              | 69 福山温泉     | 89 高宮温泉福寿荘  |
| 10 湯の川温泉      | 29 観水園      | 50 竹原簡保保養センター        | 70 ヘルス共和国Z  |             |
| 11 潮原温泉       | 30 桜井ヨシ     | 51 ホテル賀茂川荘           | 71 西光寺温泉    |             |
| 12 冠高原グリーンクラブ | 31 共立組      | 52 ホテル峰夢             | 72 俄山弘法大師湯  |             |
| 13 羅漢温泉       | 32 菊真温泉     | 53 花むら温泉             | 73 府中温泉     |             |
| 14 小瀬川温泉(1-3) | 33 音戸温泉     | 54 長寿閣               | 74 片岡温泉     |             |
| 15 山惣温泉       | 34 広島遊園地    | 55 久野島温泉             | 75 親子地藏龍統湯  |             |
| 16 岩倉温泉       | 35 二葉山天然温泉  | 56 仏通寺温泉             | 76 甲山温泉     |             |
| 17 中西忠彦       | 36 天神谷温泉    | 57 尾道トラックステーション(1-3) | 77 矢野温泉(新)  |             |
| 18 のうが温泉      | 37 伊藤稲造     | 58 ろうしお温泉            | 78 甲奴温泉     |             |
| 19 八幡川峡温泉     | 38 寿康湯      | 59 いいい荘(1-3)         | 79 庄原温泉     |             |
| 20 湯舟温泉       | 39 鯉城温泉     | 60 千光寺温泉             | 80 片山温泉     |             |
|               | 40 こごもり遊園   |                      |             |             |

陰側にあり、鳥取県及び島根県の高温の温泉は火山帯付近に存在していることから、熱源として火山帯が関係していると考えられる。同様に、A及びD地域はB及びC地域より火山帯に近い比較的高い温度のものが存在するものと思われる。また、掘削深度と泉温の関係についてみると、A地域にある鉱泉No.14の掘削前の泉温は14.7°C、221m掘削した鉱泉では17.1°Cであり、D地域にある鉱泉No.77の場合は掘削前の鉱泉の温度は23—24°Cであるが、新しく500m掘削したものでは泉温30°Cであることから、掘削による泉温の上昇が僅かではあるが期待出来るものと思われる。

2. ラドン

鉱泉分析法指針に基づく療養泉の基準を越えている鉱泉は81あり、そのうち50マッヘ以上の放射能泉はA及びC地域に9あるがB及びD地域には高濃度の鉱泉はなく、すべて50マッヘ未満の弱放射能泉に該当する。

ラドンを多く含む鉱泉は花崗岩地域に多いことが知られている。A、B及びC地域は広島花崗岩が広く分布しているのに対してD地域はそれ以前の深成岩活動により生じた、古期又は新期花崗岩が主である。これら花崗岩の違いがラドン含有量に及ぼす影響を調べるために、地形の類似しているA地域とD地域について統計的に比較検討した。(B及びC地域については後述するが海水或は表流水の影響があると思われるので除いた。)結果は表1のとおり、広島花崗岩を基盤岩としているA地域は

表1 ラドン含有量と花崗岩の種類の関係

	花崗岩の種類	
	広島花崗岩 (A地域)	古期・新期・未区分 花崗岩(D地域)
n	19	10
平均値の差の検定	t=2.301*	

\*危険率5%で有意差あり

D地域より有意にラドン含有量が高かった。このことから、深成岩活動の新しい地域ほどラドン含有量の多いという仮説がたてられる。

広島花崗岩地域におけるラドン含有量と主要な陰陽イオンの関連について検討したところ、陰イオンのCl<sup>-</sup>、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>及びHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>を多い順に並べた場合の並び方とラドン含有量には関連があるように見受けられるので統計

表2 広島花崗岩地域のラドン含有量と陰イオンの型の関係

	陰イオンの型	
	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> >Cl <sup>-</sup> >SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> 型	その他の型
n	26	45
平均値の差の検定	t=2.605*	

\*危険率5%で有意差あり

的に検討した結果、表2のとおり、HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>>Cl<sup>-</sup>>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>型の鉱泉は他の型の鉱泉に比べて有意にラドン含有量の高いことがわかった。HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>の起源については主に二つの場合が考えられている[5]。一つはマグマからの火山性ガスによるもの、他の一つは堆積層中での有機物質の分解によるCO<sub>2</sub>の増加である。県内の鉱泉は火山帯から遠く、火山性のもとは考えにくいので堆積層中での有機物質の分解によるものと考えられる。岩崎[6]はラドンを供給する物質は地表近くにあると報告し、又佐藤等[7]は未固結の堆積層中から採水した鉱泉水と固結した基盤の岩石中から採水した鉱泉水のラドン濃度を比べた場合、未固結の堆積層中から採水した鉱泉水のほうが高いことを報告している。これらの報告について考えると、ラドンの多い場所とHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>が多い場所は、存在位置が符合し、ラドンの放出とHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>の量には関係があることを示唆している。

河川水、雨水等はSO<sub>4</sub><sup>2-</sup>>Cl<sup>-</sup>であることからHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>>Cl<sup>-</sup>>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>型の鉱泉は雨水等による希釈が進んでいないためラドン濃度を高く保持したまま湧出しているものとする。県内でラドン濃度の最も高い鉱泉はC地域のNo.57であり、3カ所の泉源を持っているが、それらの泉源は互いに200m以内に近接しており、深度は64—70mと条件は非常に似ている。しかしラドン濃度については52.6—270マッヘと、泉源により大差がある。ラドン濃度の高い泉源が局在していると言うことは帯水層が狭い範囲に限定されていることを意味すると考えられるので、過剰揚水による枯渇に注意するとともに乱開発の防止に留意する必要がある。

国内でラドン含有量の多い鉱泉としては増富温泉、池田温泉、三朝温泉等が知られている(1,200—700マッヘ)[8]がこれらの鉱泉に比べると県内の鉱泉ラドン濃度はそれほど高いものではない。

3. 蒸発残渣

1,000mg/l以上の溶存物質を含有している鉱泉は13あ



る。A地域には溶存物質量の多いものはみられず、B及びC地域のNo.32, 33, 45, 58, 59-1, 59-2, 59-3, 64の8鉱泉は三角州に存在しているか、又は海岸に非常に近い位置にあるので潮の干満及び過剰揚水による海水の浸入等の影響が懸念される。事実、59-1は陽イオンの並び方が  $Na^+ > Mg^{2+} > Ca^{2+} > K^+$ 、陰イオンは  $Cl^- > SO_4^{2-} > HCO_3^-$  であり、海水と同様である。

甘露寺等は伊豆半島南西部の温泉において海水が温泉水化する場合の成分変化について解析している〔9〕。これは海水と温泉水について  $Cl^-$  と各成分の比率を比較することで海水が温泉水化する場合の各成分の量的変化を推定する方法である。その方法に従って海に近い塩類泉を表3のようにまとめた。

$K^+$ ,  $Na^+$  及び  $SO_4^{2-}$  が減少していることと  $Ca^{2+}$  が増加していることは甘露寺等の検討結果とほぼ一致し、海水が鉱泉水化したものと考えられる。

特に変化の著しい  $K^+$  と  $Ca^{2+}$  について考えてみると、 $K^+$  の減少の度合いが大きいのは土壤等による吸着又はイオン交換等が他成分より早く起こるためと思われる。 $Ca^{2+}$  は増加の傾向を示したがこれは土壤等からの溶出によりその比率を増して行くものと考えられる。従って、B及びC地域の海に近い鉱泉においては、比率変化の大きい  $Cl^-/K^+$  及び  $Cl^-/Ca^{2+}$  を追うことにより海水の鉱泉水に与える影響の程度を知ることが出来るものと考えられる。

D地域の塩類泉はB, C地域のもの比べると  $Na^+$  及び  $HCO_3^-$  の挙動が違ふ。これは調枝の報告〔1〕にあるように化石水等の特異な鉱泉水の存在するためと考えられる。

#### 4. 主要成分の濃度

鉱泉成分の平均濃度を探り今後の鉱泉分析の参考とするため地域別の平均値及び標準偏差を求め表4に示し

表3 塩類泉の  $Cl^-$  と他主要成分の当量比

No.	$Cl^-/K^+$	$Cl^-/Na^+$	$Cl^-/Ca^{2+}$	$Cl^-/Mg^{2+}$	$Cl^-/SO_4^{2-}$	$Cl^-/HCO_3^-$
32	633	1.35	8.43	5.18	9.32	99.8
33	515	1.82	3.17	8.72	15.1	131
45	731	1.43	4.64	11.0	14.9	242
58	304	1.74	4.01	3.65	15.1	21.2
59-1	62.1	1.26	21.9	5.31	40.4	157
-2	88.4	1.95	4.25	4.12	31.7	47.0
-3	116	3.30	2.32	4.33	29.4	38.8
64	145	2.44	1.57	20.0	12.7	39.6
海水〔9〕	53.7	1.17	26.8	5.01	9.72	251

注 数値は mg equivalent の比で示した。

表4 主要成分の平均値

	A 地域 n=19 $\bar{x} \pm S. D.$	B 地域 n=32 $\bar{x} \pm S. D.$	C 地域 n=13 $\bar{x} \pm S. D.$	D 地域 n=10 $\bar{x} \pm S. D.$	全地域 n=74 $\bar{x} \pm S. D.$	全国平均 〔10〕
蒸発残渣	114±83	116±48	211±97	205±190	144±106	2520
ラドン	36.6±35.0	18.3±9.6	40.3±68.1	10.2±2.0	25.8±36.0	4.39
$K^+$	1.4±1.8	1.5±1.8	2.4±2.6	2.5±3.9	1.7±2.4	32.8
$Na^+$	22±26	12±6.1	27±26	46±58	21±30	441
$Ca^{2+}$	6.4±5.9	10±7.7	20±12	9.9±7.8	11±9.5	161
$Mg^{2+}$	.67±.93	1.6±1.7	2.9±2.5	1.1±.93	1.5±1.8	19
$Cl^-$	8.4±3.6	10±7.5	36±58	38±80	18±41	530
$HCO_3^-$	48±54	39±24	78±38	71±52	52±43	298
$SO_4^{2-}$	5.0±4.1	14±8.8	14±7.8	9.4±6.2	11±8.4	380
ケイ酸	28±10	33±12	44±13	34±11	34±13	93

単位: mg/ℓ, ラドンはマッヘ(蒸発残渣 1,000 mg/ℓ 以上の泉源は除いた。)

た。なお、蒸発残渣 1,000 mg/l を越える例外的なもの  
は計算から除いた。

蒸発残渣、K<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>、HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>：C及びD地域が高い傾  
向にあった。

ラドン：A及びC地域が高い傾向にあった。

C地域が高いのは調枝の報告〔1〕と異なるがこれは最  
近ラドン濃度の高い鉱泉が尾道市周辺で数か所見つかっ  
たことによるものである。

Na<sup>+</sup>：B地域が低くD地域が高い傾向にあった。

Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>：A地域が低くC地域が高い傾向にあっ  
た。

SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>：A地域が低くB及びC地域が高い傾向にあっ  
た。

全国的な平均値〔10〕と比較するとラドン濃度が高く、  
他の成分はいずれもかなり低いことが本県の鉱泉の特徴  
である。

### 5. 各主要成分間の相互関係

酒井によると湧泉の性格を規定する条件としては次の

4項目があげられている〔11〕。

- ① 降水量と降水状況
- ② 涵養地帯の性質とその構造
- ③ 地形
- ④ 地下水包蔵体の水文地質とその構造

主要成分の相互関係は上記4項目を反映するものと考え  
られるので、各地域の特徴を明らかにするため地域別  
の鉱泉成分相互の直線回帰分析による相関を調べた（図  
5-1から5-4）。危険率1%で有意であったもの  
のうち特に相関の強いものには下線をつけた。なお塩類泉  
については計算から除いた。

その結果から各地域の特徴について次のように考察し  
た。

#### 1) A地域

蒸発残渣とNa<sup>+</sup>及びHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>の間に強い正の相関  
がみられ、Na<sup>+</sup>とHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>間の相関も強いので蒸発残  
渣の増加に寄与している主成分はNa<sup>+</sup>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>と考え  
られ、この地域の土壌又は鉱物中のNa<sup>+</sup>の比率は高い  
と思われる。他成分ではK-Ca間及びMg-Cl間に相

表 5-1 主要成分の相関関係 (A地域)

	蒸発残渣	ラドン	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	ケイ酸
蒸発残渣	1									
ラドン	.222	1								
K <sup>+</sup>	.303	-.066	1							
Na <sup>+</sup>	.946	.172	.108	1						
Ca <sup>2+</sup>	.170	.042	.802	-.110	1					
Mg <sup>2+</sup>	.075	-.252	.275	-.169	.646	1				
Cl <sup>-</sup>	.262	-.137	.286	.067	.508	.797	1			
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	.957	.130	.419	.856	.356	.277	.435	1		
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	.097	-.249	.361	.023	.375	.305	-.047	.139	1	
ケイ酸	.170	.263	.599	-.056	.665	.401	.266	.190	.376	1

表 5-2 主要成分の相関関係 (B地域)

	蒸発残渣	ラドン	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	ケイ酸
蒸発残渣	1									
ラドン	-.094	1								
K <sup>+</sup>	.452	-.173	1							
Na <sup>+</sup>	.448	.071	-.072	1						
Ca <sup>2+</sup>	.813	-.224	.538	-.014	1					
Mg <sup>2+</sup>	.882	-.153	.490	.090	.833	1				
Cl <sup>-</sup>	.849	-.183	.467	.308	.724	.809	1			
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	.766	-.008	.468	.488	.619	.669	.486	1		
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	.405	-.409	-.008	-.062	.492	.382	.425	-.102	1	
ケイ酸	.429	.111	.174	.035	.321	.361	.364	.121	.191	1

表 5-3 主要成分の相関関係 (C地域)

	蒸発残渣	ラドン	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	ケイ酸
蒸発残渣	1									
ラドン	-.048	1								
K <sup>+</sup>	.026	-.149	1							
Na <sup>+</sup>	.839	-.095	-.177	1						
Ca <sup>2+</sup>	.841	.013	.140	.555	1					
Mg <sup>2+</sup>	.157	-.002	.375	-.174	.077	1				
Cl <sup>-</sup>	.870	-.034	-.153	.947	.672	-.114	1			
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	.016	-.092	.387	-.293	.183	.430	-.401	1		
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	.188	.137	.013	-.222	.347	.386	-.074	.122	1	
ケイ酸	-.162	.222	.104	-.311	-.005	.153	-.147	.085	-.108	1

表 5-4 主要成分の相関関係 (D地域)

	蒸発残渣	ラドン	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	ケイ酸
蒸発残渣	1									
ラドン	-.210	1								
K <sup>+</sup>	.873	-.153	1							
Na <sup>+</sup>	.966	-.222	.920	1						
Ca <sup>2+</sup>	.497	.038	.191	.277	1					
Mg <sup>2+</sup>	.395	.276	.121	.168	.847	1				
Cl <sup>-</sup>	.922	-.228	.978	.964	.220	.122	1			
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	.725	.155	.407	.583	.797	.772	.437	1		
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	.456	-.388	.317	.457	.251	.085	.382	.252	1	
ケイ酸	.514	-.484	.115	.381	.515	.421	.279	.498	.241	1

関が高い。Mg-Cl については土壌などからの MgCl<sub>2</sub> の溶出が考えられるが、K-Ca については不明である。

2) B地域

この地域は花崗岩の風化地域であり、鉱泉水は伏流水等の影響を受けやすいとされている[1]。各成分間の関係は蒸発残渣と Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Cl<sup>-</sup> 及び HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> との間に強い正の相関がみられ、他に Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Cl<sup>-</sup> の3成分間相互に強い相関がみられるので土壌などから Ca 又は Mg の塩化物を主とし、重炭酸塩も溶出していると考えられる。A地域と比べると二価の陽イオン及び Cl<sup>-</sup> が蒸発残渣の増加に関与していることが異なる。Ca<sup>2+</sup> 及び Mg<sup>2+</sup> に関して、県北西部の井戸水(本研究のA地域に相当)と下流域の井戸水では下流域の井戸水の硬度がかなり高いとの報告[12]があることを考えると、下流域にあたるB地域の鉱泉水がそのような地下水の影響を受けたと考えることも出来る。

3) C地域

蒸発残渣と Na<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup> 及び Cl<sup>-</sup> との間に強い正の相

関がみられ、Na<sup>+</sup> と Cl<sup>-</sup> の間にも強い相関がみられたので、蒸発残渣の増加に関与しているのは主として NaCl であり副成分として CaCl<sub>2</sub> が考えられる。このことは上記A、B地域とは異なり、調枝[1]の述べるように海水或は表流水の混入によるものと考えられる。

4) D地域

この地域の地質が前3地域と異なっているのは前述のとおりである。蒸発残渣と K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup> 及び Cl<sup>-</sup> の間に強い正の相関がみられ、K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup> の3成分間相互に強い相関がみられたので、蒸発残渣の増加に関与しているのは主として NaCl であり副成分として KCl が考えられる。K<sup>+</sup> と Na<sup>+</sup> 間及び HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> と二価の陽イオン間に相関が強いのは他の3地域と異なる。

ま と め

県内鉱泉の主要成分の濃度と成分相互の関連について検討した結果の概要は次のとおりである。

1. 泉温についてはA及びD地域に25°C以上の低温泉

に該当するものが6あり、両地域は掘削による泉温の上昇が僅かながら期待出来るものと思われる。

2. ラドン50マッヘ以上の放射能泉はA及びC地域に9あるがB及びD地域には高濃度の鉱泉は見られない。

広島花崗岩を基盤岩としているA地域はそれ以前の火成活動により生成した花崗岩を基盤岩としているD地域よりラドン濃度が高い傾向が見られた。

広島花崗岩地域において、 $\text{HCO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{SO}_4^{2-}$ 型の鉱泉はラドン濃度が高い傾向が見られた。

3. 蒸発残渣1,000mg/l以上の溶存物質を含有している鉱泉は13ある。A地域には溶存物質量の多いものはみられず、B及びC地域の8鉱泉は三角州に存在しているか又は海岸に非常に近い位置にあるので海水の影響が懸念される。海水と温泉水の関係について塩類泉について検討した結果B及びC地域においては $\text{Cl}/\text{K}^+$ 及び $\text{Cl}/\text{Ca}^{2+}$ の変化を追うことにより海水の鉱泉水に与える影響の程度を知ることが出来ると考えられる。

4. 主要成分の平均的な濃度を探る目的で地域別の平均値±標準偏差を求めた結果、各主要成分の濃度には地域差があると考えられる。

5. 主要成分間の相互関係について、直線回帰分析により検討した結果、各主要成分間の相互関係は4地域で異なり、地域の特徴がより明らかとなり、このことから調枝の地域分類が支持できる。

なお主要成分の経年変化、 $\text{F}^-$ 及び重金属等の微量成

分の動向については今後の検討課題である。

終わりに、本研究にあたり有益な御助言をいただいた当衛生研究所理化学部長坂本征則博士に謹んで謝意を表します。

## 文 献

- [1] 調枝勝幸：広島県衛研・公害研研究報告，21，1 (1974)。
- [2] 広島県：広島県地質図，(1963)。
- [3] 厚生省：衛生検査指針，(1957)。
- [4] 環境庁：鉱泉分析法指針，(1978)。
- [5] 瀬野錦蔵，湯原浩三：温泉学，地人書館，1985，P. 167。
- [6] 岩崎岩次：温泉工学会誌，7，109 (1969)。
- [7] 佐藤和郎，佐藤純：温泉工学会誌，11，68 (1976)。
- [8] 地下水ハンドブック編集委員会編：地下水ハンドブック，建設産業調査会，1980，P. 163。
- [9] 甘露寺康雄，田中 昭：温泉工学会誌，14，88 (1980)。
- [10] 鈴木 登：温泉工学会誌，2，12 (1964)。
- [11] 酒井軍治郎：地下水学，朝倉書店，1965，P. 182。
- [12] 住川博紀，頼光彰子，金廣美智子，中村寿夫，児玉陽太郎：広島県衛研研究報告，30，51 (1983)。

## 新しいメチル化剤トリメチルシリルジアゾメタン を用いた食品中の安息香酸，サッカリンの分析

松 尾 健<sup>(a)</sup> 金 森 久 幸\* 坂 本 征 則\*

### Determination of Benzoic Acid and Saccharin in Foods by using Trimethylsilyldiazomethane as Methylation Reagent

TAKESHI MATSUO, HISAYUKI KANAMORI  
AND IKUNORI SAKAMOTO

(Received Sep. 1, 1988)

#### 結 言

食品中の添加物の分析法としてガスクロマトグラフィー (GC) が汎用されている。GCには分析対象物の気化が必須の条件であり、難揮発性化合物は揮発性を高めるため誘導体に導かれるのが通例である。一般にサッカリンの定性定量分析あるいは安息香酸、ソルビン酸等のカルボン酸の定性分析は、ジアゾメタン (DM) でメチル化後GCによって行われている〔1〕。

DMは定量性、迅速性においては他のメチル化剤に比べて優れた試薬ではあるが、爆発性、発ガン性を有するため取り扱い上で様々な難点がある。

Hashimoto 等はトリメチルシリルジアゾメタン (TMSDM) を脂肪酸のメチル化に使用し良好な結果を得ている〔2〕。著者等はこの TMSDM を DM に代わるメチル化剤として、食品添加物の分析に応用することを考え、安息香酸およびサッカリンについてメチル化における条件あるいは定量性等について検討を行ったので報告する。

#### 実 験 方 法

##### 1. 試 料

県内の製造業、スーパーマーケットから得た食品を試料とした。

##### 2. 試 薬

(1) 安息香酸標準溶液：安息香酸 (和光純薬工業株) をデンケーター中で1昼夜乾燥したものを200 mgをアセトンに溶かして100 mlとした。これをさらにアセトンで希釈して1 ml中に安息香酸として0.15 mgから1.2 mgを含むように調整した。

(2) サッカリン標準溶液：サッカリン (和光純薬工業株) をデンケーター中で1昼夜乾燥したものを酢酸エチルに溶かして100 mlとした。さらに酢酸エチルで希釈して1 ml中にサッカリンとして0.25 mgから1.5 mgを含むように調整した。

(3) サッカリン分析用内部標準溶液：アントラセン (和光純薬工業株) の50 mgをはかり、酢酸エチルに溶かして100 mlとした。

(4) TMSDM 溶液：10%ヘキサン溶液 (ガスクロ工業株)。

\* 広島県衛生研究所：Hiroshima Prefectural Institute of Public Health.

(a) 現在広島県廿日市保健所：<sup>(a)</sup>Present address: Hiroshima Prefectural Hatsuokaichi Health Center

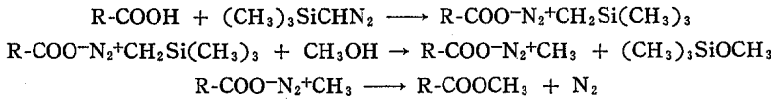


Chart 1

(5) DM・エーテル溶液：N-メチル-N-ニトロソ-P-トルエンスルホンアミドを用いて蒸留精製法により得た。

(6) 試薬はすべて市販特級品を用いた。

### 3. 試験溶液の調製

(1) 安息香酸の分析：試料20gを〔1〕の方法に従って処理し、抽出溶媒を留去した残渣にアセトンを加えて溶かし正確に10mlとする。この1mlを正確に分取し、メタノール0.2mlを加え、さらにTMSDM溶液0.3mlを加える（TMSDMの黄色が消えた場合にはさらに加える）。反応液を室温に10分以上放置後、アセトンで正確に5mlとしたものをGC分析の試験溶液とした。

(2) サッカリンの分析：試料20gを〔1〕の方法に従って処理し、試料4g当たりの抽出物にベンゼン+メタノール(7+2)0.5mlを加えて溶かし、TMSDM溶液0.15mlを加える（TMSDMの黄色が消えた場合にはさらに加える）。反応液を室温に10分以上放置後、内部標準溶液1mlを加えて酢酸エチルで正確に5mlとしたものをGC分析の試験溶液とした。

### 4. GCによる定量

(1) 装置：榊柳本製作所製G-3800(FID)。

(2) 定量方法

試験溶液を下記のGC条件で測定し、安息香酸は、安息香酸メチルのピークについて絶対検量線法により、サッカリンは、N-メチルサッカリンのピークについて内部標準法により定量を行う。

#### GC条件

(i) 安息香酸の分析；カラム：5% PEG-HT (Uniport HP, 60-80 mesh, 3mm i.d.×2m), カラム温度：110°C, 注入口および検出器温度：160°C, キャリアーガス：N<sub>2</sub>, 40ml/min, 試料注入量：5μl。

(ii) サッカリンの分析；カラム：3% OV-17 (Anakrom Q, 80-100 mesh, 3mm i.d.×1m), カラム温度：170°C, 注入口および検出器温度：200°C, キャリアーガス：N<sub>2</sub>, 40ml/min, 試料注入量：3μl。

### 結果および考察

#### 1. 安息香酸の分析

(i) TMSDMによるメチル化条件の検討

#### (i) 反応溶媒

TMSDMによるエステル化反応はChart 1に示すように進行する。この反応はメタノールを必要とするため、ベンゼン、酢酸エチル及びアセトンにそれぞれメタノールを加えた溶媒系においてHashimoto等の方法〔2〕に準じて反応を行い、安息香酸メチルの生成量について調べた。その結果、安息香酸メチルの生成量はいずれの反応溶媒でも理論値の98%以上の値を示し、反応は定量的に進行することがわかった。一般的によく用いられている分析法〔1〕では試験溶液の希釈にアセトンを使用するケースが多く、試験溶液に直接メタノールおよびTMSDMを加えるだけでメチル化が出来るので反応溶媒にはアセトンを選択することにした。

#### (ii) メタノールの添加量

次にメタノールの最適値について検討を行った。安息香酸が添加された醤油の抽出試料溶液1ml(約1mgの安息香酸を含有)に溶媒中のメタノール量を変化させて、TMSDM溶液を反応させたところ、Fig. 1に示すように、アセトン：メタノール10：3までは安息香酸メチルの生成量は一定であった。このことから、試料溶液1mlに対してメタノール0.2mlを添加することにした。

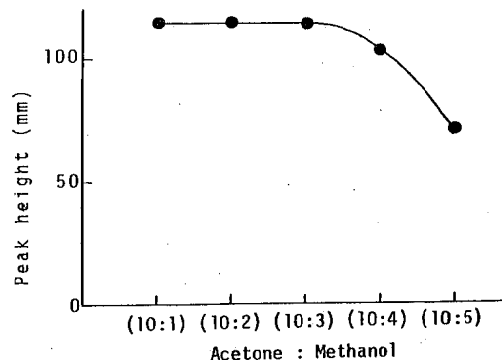


Fig. 1. Effect of Mixed Ratio of Reaction Solvent on the Formation of Methyl Benzoate.

#### (iii) TMSDM量

(ii)で使用した試料溶液1ml中の安息香酸(約1mg, 8.2 × 10<sup>-3</sup> mol)をエステル化するのに必要なTMSDM

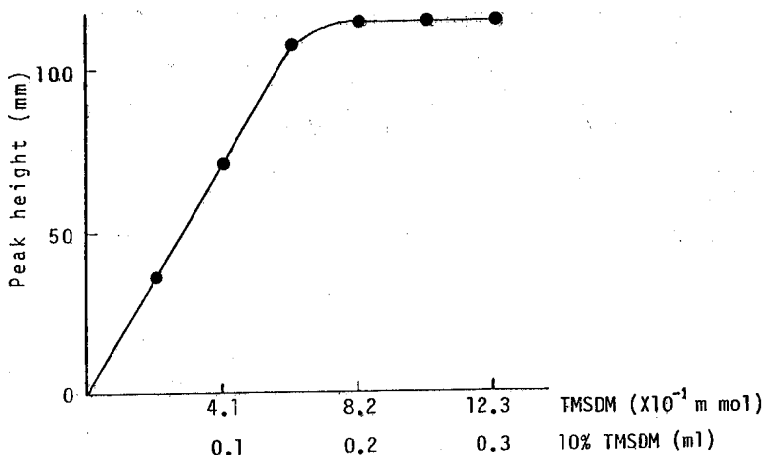


Fig. 2. Effect of TMSDM Concentration on the Formation of Methyl Benzoate.

量について検討を行った。結果は Fig. 2 に示したとおりで、TMSDM 濃度が  $1.8 \times 10^{-1}$  m mol (TMSDM 溶液で 0.2 ml) 以上で、安息香酸メチルの生成量は一定値を示した。TMSDM 量は TMSDM 溶液 0.3 ml 程度が適当と考えられるが、TMSDM の黄色が消える場合には、反応を完結させるために黄色が残るまで TMSDM 溶液を加える必要がある。

(iv) 反応時間

上記の試料溶液 1 ml にメタノール 0.2 ml, TMSDM 溶液 0.3 ml を添加して、放置時間と安息香酸メチル生成量について調べた。その結果、Fig. 3 に示すように、5 分以後安息香酸メチルの生成量は一定値を示し、反応は速やかに完結するものと思われたが、反応時間は安全を

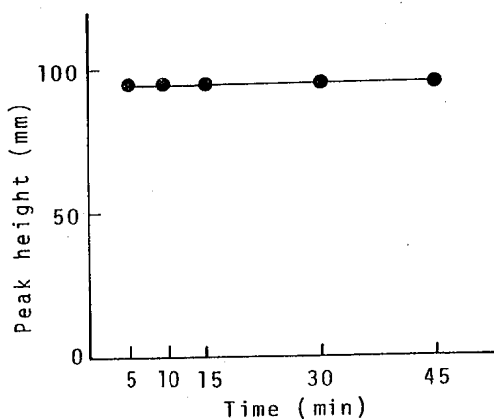


Fig. 3. Effect of Reaction Time on the Formation of Methyl Benzoate.

考慮し 10 分以上とした。これらの反応条件で生成した安息香酸メチルのピーク高さは 24 時間後でも変化が認められなかった。

(2) 検量線

検量線は Fig. 4 に示すように、0.15  $\mu$ g から 1.2  $\mu$ g の範囲で良好な直線性を示した。また、各濃度における変動係数 ( $n = 3$ ) も 3.0% 以下で再現性も良好であった。

(3) DM 法と TMSDM 法による食品中の安息香酸の定量値の比較

TMSDM 法の定量精度を、従来から使用されている DM 法と比較するため、安息香酸を含まない醬油に 0.5 g/kg, 0.1 g/kg の割合で添加したものについて定量分

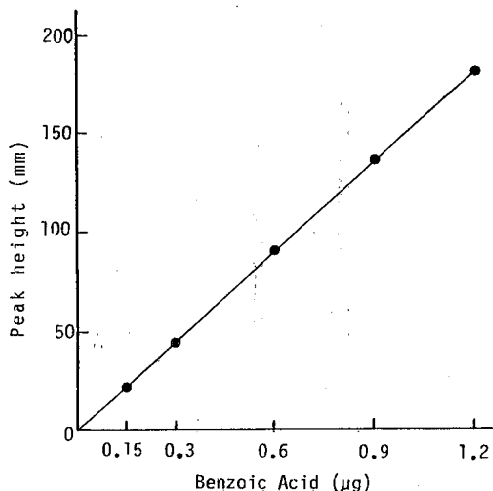


Fig. 4. Calibration Curve of Benzoic Acid.

Table 1. Analytical Values Obtained by DM and TMSDM

Sample food	DM			TMSDM			TMSDM DM
	Found (g/kg)	C.V. <sup>a)</sup> (%)	Recovery (%)	Found (g/kg)	C.V. <sup>a)</sup> (%)	Recovery (%)	
Soy Sauce No. 1 (Added 0.5 g/kg)	0.488	1.2	98	0.489	1.2	98	1.00
No. 2 (Added 0.1 g/kg)	0.091	3.8	91	0.093	4.3	93	1.02

a) n=3

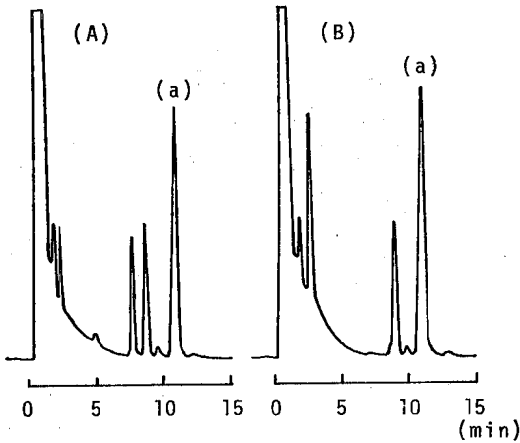


Fig. 5. Gas Chromatograms of Ether Extract of Soy Sauce Methylated with DM(A) and TMSDM(B).  
(a) Methyl Benzoate.

析を行った。その結果を Table 1 に示したが、両法による定量値はよく一致しており、変動係数 (n=3) も TMSDM 法では 1.2%, 4.3% と DM 法の 1.2%, 3.8% とほぼ同程度で再現性のあることも確認された。

なお、ガスクロマトグラムは Fig. 5 に示すように、TMSDM 法と DM 法とではパターンが若干異なるが、分析には影響を及ぼさなかった。

## 2. サッカリンの分析

### (1) TMSDM によるメチル化条件の検討

#### (i) 反応溶媒

サッカリンはラクタム-ラクタム互変異性を有する化合物で、一般にはラクタム型に偏っている。メチル化によってラクタム型からは N-メチル、ラクチム型からは O-メチルサッカリンが生成し、その生成比は反応溶媒やメチル化剤の種類によって異なる。DM・エーテル溶液によるメチル化では、N-メチルサッカリンの生成比

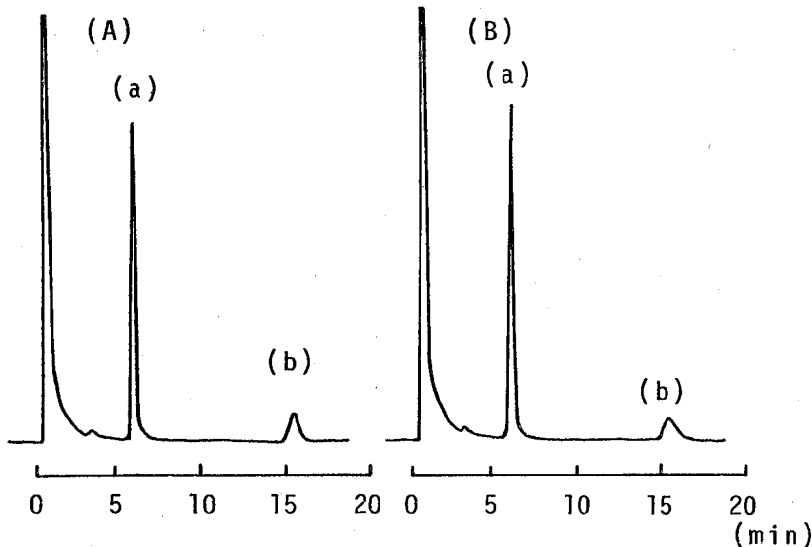


Fig. 6. Gas Chromatograms of Saccharin Methylated with DM(A) and TMSDM(B).  
(a) N-Methyl Saccharin. (b) O-Methyl Saccharin.



が17:3と高く、ヨウ化メチルによる場合では、N-メチルサッカリンのみが生成することが知られている[1]。そこでまず、Hashimoto 等の方法[2]に準じて TMSDM を使用した時のN-メチルおよびO-メチルサッカリンの生成比について、検討を行った。その結果、Fig. 6に示すようにDM・エーテル溶液によるメチル化の場合とほぼ同様の比率でN-メチル体とO-メチル体が生成するこが認められた。

次に、反応溶媒について検討した。ベンゼン、クロロホルム、酢酸エチル、アセトン及びアセトニトリルにそれぞれメタノールを加えた溶媒系において Hashimoto 等の方法[2]に準じてメチル化を行った。その結果、ベンゼンを用いた場合に生成するN-メチルサッカリンの量を1.00とした時、クロロホルムで1.00、酢酸エチルで0.97、アセトンで0.84、アセトニトリルで0.73の値を示し、溶媒の極性が高くなるに従ってN-メチルサッカリンの生成量は減少する傾向が見られた。N-メチルサッカリンの生成量はベンゼンとクロロホルムでは同じであったが、ガスクロマトグラフへの影響を考慮して、反応溶媒としてはベンゼンを選択した。

(ii) メタノールの添加量

N-メチルサッカリンの生成におけるベンゼン:メタノールの至適混合比について、たくあん漬けの抽出試料(約1.1mgのサッカリンを含有)を用いて検討を行った。その結果、Fig. 7に示すように、ベンゼン:メタノール6:3まではN-メチルサッカリン生成量は一定であった。そこで混合比は Hashimoto 等の報告[2]と同じ(7:2)とした。また反応溶媒の量について検討を行

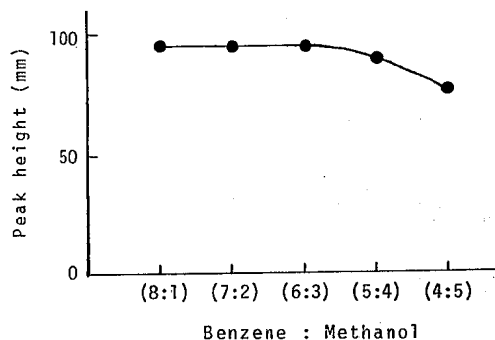


Fig. 7. Effect of Mixed Ratio of Reaction Solvent on the Formation of N-Methyl Saccharin.

ったところ、0.5 mlで、たくあん漬けの抽出試料を溶かすことができ、N-メチルサッカリンのピークが Fig. 7の高さまで達したので、反応溶媒量は0.5 mlとした。

(iii) TMSDM 量

(ii)で使用した試料(約1.1mg,  $6.0 \times 10^{-3}$  m molのサッカリンを含有)を用いて検討を行ったところ、Fig. 8に示すように、TMSDM 濃度 $8.8 \times 10^{-2}$  m mol (TMSDM 溶液0.1ml)以上でN-メチルサッカリン生成量は一定値を示した。このことから、TMSDM 量は TMSDM 溶液0.15 ml程度が適当と考えられるが、TMSDMの黄色が消える場合には反応を完結するため黄色が残るまで TMSDM 溶液を加える必要がある。

(iv) 反応時間

上記の試料にベンゼン:メタノール(7:2)0.5 ml,

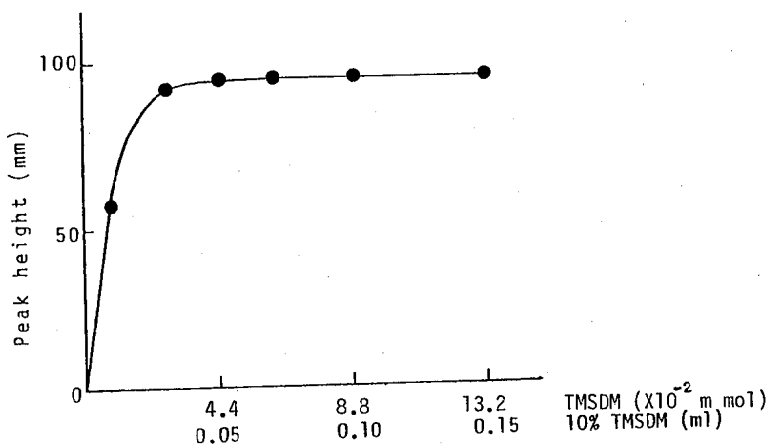


Fig. 8. Effect of TMSDM Concentration on the Formation of N-Methyl Saccharin.

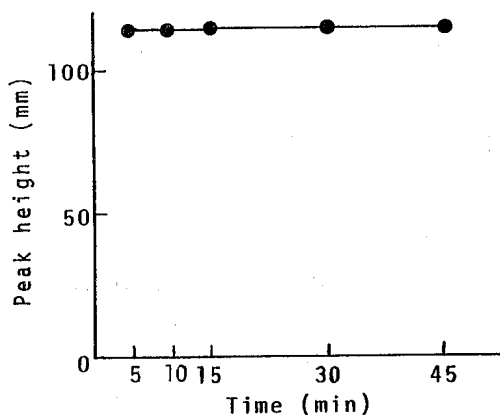


Fig. 9. Effect of Reaction Time on the Formation of N-Methyl Saccharin.

TMSDM 溶液 0.15 ml を添加して放置時間と N-メチルサッカリン生成量との関係を調べた。その結果、Fig. 9 に示すように、5 分以後 N-メチルサッカリンの生成量は一定値を示した。したがって、反応時間は安息香酸の場合と同様に 10 分以上とした。これらの反応条件で生成した N-メチルサッカリンのピーク高さは反応から 48 時間後まで変化が認められなかった。

(2) 検量線

検量線は Fig. 10 に示すように、サッカリンとして 0.15 μg から 0.9 μg の範囲で良好な直線性を示した。また各濃度における変動係数 (n = 3) も 2.3% 以下で再現性も良好であった。

(3) DM 法と TMSDM 法による食品中のサッカリンの定量値の比較

TMSDM 法の定量精度を、従来から使用されている DM 法と比較するため、サッカリンが添加されているたくあん漬 3 検体、奈良漬、清涼飲料水各 1 検体につ

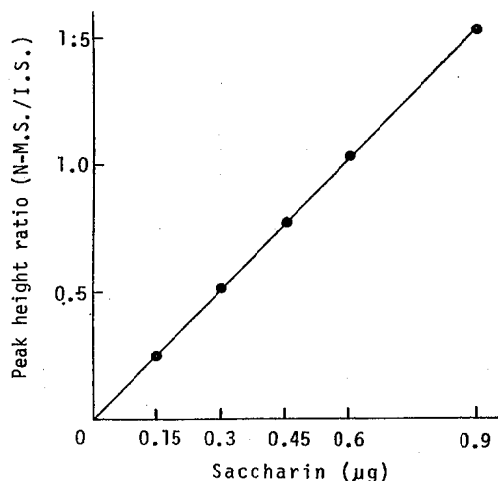


Fig. 10. Calibration Curve of Saccharin.  
N-M.S.: N-Methyl Saccharin.  
I.S.: Internal Standard.

いて定量分析を行った。実験結果を Table 2 に示した。両法による定量値は非常によく一致しており変動係数も TMSDM 法では 0.4 から 2.1% と DM 法の 0.4 から 3.0% とほぼ同程度であり、再現性のあることも認められた。

なお、Fig. 11 に奈良漬の抽出試料のガスクロマトグラムを示すが、TMSDM 法によるパターンは DM 法によるパターンとよく一致していた。

ま と め

メチル化剤のトリメチルシリルジアズメタンによる安息香酸およびサッカリンのメチル化法を検討し、ガスクロマトグラフィーで分析する方法を確立した。本法を市販食品へ応用した場合の定量値は、従来から使用されて

Table 2. Analytical Values Obtained by DM and TMSDM

Sample food	DM		TMSDM		TMSDM / DM
	$\bar{x}$ (g/kg)	C.V. <sup>a)</sup> (%)	$\bar{x}$ (g/kg)	C.V. <sup>a)</sup> (%)	
Takuan-zuke No. 1	0.362	0.4	0.361	0.6	0.99
No. 2	0.108	3.0	0.110	1.8	1.01
No. 3	0.275	2.1	0.272	0.6	0.99
Nara-zuke	0.728	0.5	0.727	0.4	0.99
Soft Drink	0.051	2.8	0.052	2.1	1.02

a) n = 3

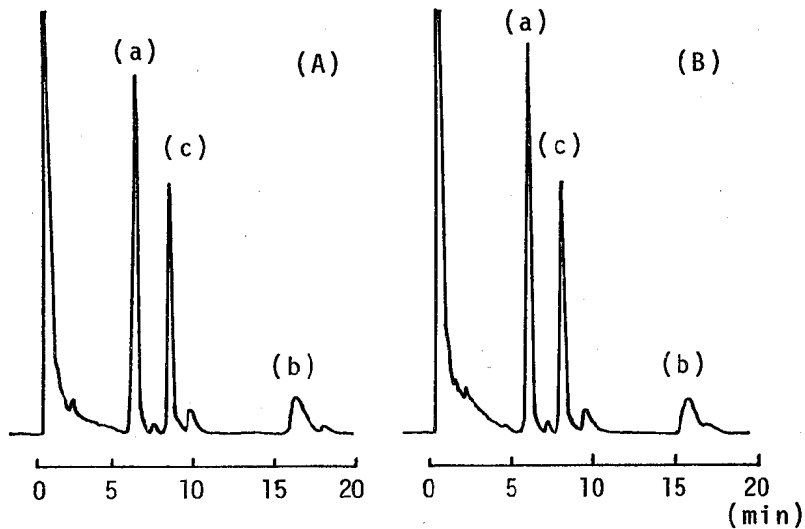


Fig. 11. Gas Chromatograms of Ether Extract of Nara-zuke Methylated with DM(A) and TMSDM(B).

- (a) N-Methyl Saccharin.
- (b) O-Methyl Saccharin.
- (c) Internal Standard (Anthracene).

いるジアゾメタン法とよく一致した。また本メチル化法は、操作が簡便で、しかも操作を安全に行える等、日常の業務に適していると思われる。

なお、桃園等は本年札幌で開催された第25回全国衛生化学技術協議会年会において、トリメチルシリルジアゾメタンのサッカリンのメチル化への応用について報告していることを付記する。

#### 文 献

- [1] 厚生省環境衛生局食品化学課編：食品中の食品添加物分析法，講談社，東京，(1981)，P. 187, P. 207.
- [2] N. Hashimoto, T. Aoyama and T. Shioiri: *Chem. Pharm. Bull.*, 29, 1475 (1981).

## 他誌掲載論文要約(1987年11月～1988年10月)

武井直巳, 高尾信一, 妹尾正登, 清谷克寛\*: 動物・インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼに関する研究. 広島県獣医学雑誌, 3: 41～49, 1988.

N-acetylneuramin-lactose 及び 4-methylumbelliferyl-N-Ac- $\alpha$ -D-neuraminide をそれぞれ基質とする呈色比色測定法及び蛍光比色測定法によって, 動物由来インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ (NA) 活性及びその  $Ca^{2+}$  イオン依存性における pH 依存性をみた.

動物由来インフルエンザウイルスとして, トリ由来株: 4株, ウマ由来株: 3株, ブタ由来株: 3株及びヒト・インフルエンザウイルスのA型: 2株, B型: 2株を供試し, その発育鶏卵感染尿液の部分精製液を酵素液として, 呈色, 蛍光両測定法において pH 4.0～7.0 の間の9段階の pH について, それぞれ 10mM EDTA 添加及び非添加の系における各供試株の NA 活性を測定した.

ヒトA型株は両測定法においていずれの pH においても EDTA 存在下で NA 活性が認められず, その NA 活性の  $Ca^{2+}$  イオン依存性は pH によらないことが示されたが, B型株のそれは pH 5.0 以上の pH 域では酵素活性の回復があり pH 依存性が認められた.

動物由来株のうちヒトA型株と同様の傾向を示したものは, トリ由来の A/whistling swan/Shimane/473/83 株及びブタ由来の A/swine/Iowa/15/30 株のみであった. 他の株は株によって程度の差は認められたが, いずれも pH 5.0 以上の pH 域では pH によって 20%～100% の酵素活性の回復があり, その NA 活性の  $Ca^{2+}$  イオン依存性に pH 依存性が認められた.

\*広島大学医学部細菌学教室

Kiyotani, K\*, N. Takei, M. Senoo, S. Takao, K. Otsuki\*\*, M. Tsubokura\*\* and T. Yoshida\*: Enzymological Characteristics of Avian Influenza A Virus Neuraminidase. Microbiol. Immunol., 31 (11): 1131—1135, 1987.

トリ由来インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼについて, いずれも渡り鳥から分離された18株を供試して, 呈色比色測定法 (基質: fetuin) 及び蛍光比色測定法 (基質: 4-methylumbelliferyl-N-Ac- $\alpha$ -D-neura-

minide) の両法でその活性を測定した.

呈色比色測定法/蛍光比色測定法の活性比は2.4～20.3を示し一定の傾向は認められなかった. 一方供試ウイルス株は酵素活性において  $Ca^{2+}$  イオン依存性を示し, この点同じA型インフルエンザウイルスにあってもヒト・インフルエンザA型ウイルスとは明らかに異なった. この点についてはもっと広い範囲のトリ・インフルエンザウイルス株について追求する必要があると思われる.

\*広島大学医学部細菌学教室

\*\*鳥取大学農学部獣医学科家畜微生物学教室

Kanamoto, Y., H. Nakano\*, T. Sumii\*, Y. Matsuo\*\* and H. Kotani\*\*\*: Colonization with genital mycoplasmas in pregnant women and their neonates and birth weight. Zbl. Bakt. Hyg., A265: 263—267, 1987.

妊婦の泌尿生殖器に分布するマイコプラズマが新生児にどのような影響を与えるかを調査する目的で, 妊婦114名, 新生児84名について *Mycoplasma hominis* と *Ureaplasma urealyticum* の検索を行った. 妊婦については妊婦末期の尿及び頸管スワブを, 新生児では出生後6日以内の尿をそれぞれ分離材料とした. *U. urealyticum* は妊婦から73.7%, 新生児から17.9%に, また *M. hominis* は妊婦から8.8%, 新生児から1.2%にそれぞれ分離された. 妊婦では出産経験が増すにしたがって分離率が低下する傾向がみられた. *U. urealyticum* の新生児への伝播は男子に比べて明らかに女子に高い傾向がみられたが, 妊婦尿中の菌密度と新生児への伝播との間には相関はみられなかった. *U. urealyticum* 陽性の新生児の尿中には既に成人と同程度 (平均  $10^4$  ccu/ml) の高密度にこれが存在した. 妊婦及び新生児からのマイコプラズマの分離の有無ないし程度と在胎週数, 出生時体重との間に有意の差は認められなかった.

\*広島大学医学部泌尿器科学教室

\*\*広島大学医学部細菌学教室

\*\*\*Institute for Medical Research, New Jersey, USA

水田満里, 海佐裕幸: 神経芽細胞腫のマス・スクリー

ニングについて一湿ったろ紙尿の細菌汚染の問題点について、日本公衆衛生雑誌、35:179-183, 1988.

乳幼児を対象とした神経芽細胞腫のマスキングの検体の中で、湿ったろ紙尿は細菌によって腐敗していることが多い。

細菌によるろ紙尿の腐敗が測定物質であるVMAやHVAおよびクレアチニンに及ぼす影響について実験的な検討を行った結果、以下のことが判明した。細菌に汚染された湿ったろ紙尿は30°C放置後1日でVMA, HVA, クレアチニンが低下しはじめ、とくにクレアチニンとHVAの低下が著しかった。無菌の湿ったろ紙尿と乾燥したろ紙尿ではいずれも測定物質は安定であった。VMA, HVA, クレアチニンの低下の程度は細菌の種類によって大きく異なり、これらの値に影響を与えない細菌群と、低下を顕著に引き起こすある種の *Corynebacterium* 属の細菌がいることが判明した。

小川博美, 岸本敬之, 得能弘志, 佐々木実己子: 広島湾の衛生指標菌による汚染パターン分類。広島県獣医学会雑誌 No.3: 54-63, 1988.

本研究は広島湾の海水汚染状況を1962-1986年の25年間について、衛生指標菌を用いた平面的パターン分類の推移で検討を試みた。25年間の海水調査より得られた

データは延べ6,156定点からのもので、これらデータは毎年11月~2月の海水についてAPHA法により、大腸菌群最確数(TC MPN)及び糞便性大腸菌群最確数(FC MPN)を求めたものである。調査海域を4Km毎の115区画に、また調査期間を5年毎のI-V期に区分し、それぞれに該当する定点を選び出しその中央値、平均値及びTC MPNの230, 2,300を超えるデータの比率、FC MPNの49, 490を超えるデータの比率を求めた。以上の数値処理により、TC法、FC法及びクラスター法の3方法を用いて汚染度の高い順にA~Dパターンの4段階に海域分類を行い、各期間毎及び方法別による検討を実施し次の結果を得た。

① パターン分類による広島湾の汚染推移は、I期からII期にかけて太田川河口部及び沿岸海域に汚染が拡大し、II期が全期間を通じて汚染のピークを示し、III~V期では明らかな汚染縮小傾向が認められた。V期ではI期( $P \leq 0.05$ )及びII期( $P \leq 0.01$ )に比較して有意な縮小が認められた。

② 分類方法別では、TC法>FC法>クラスター法の順位で拡大パターンの評価を示したが、TC法とFC法間にはいずれの期間においても有意差は認められなかった。

広島県衛生研究所研究報告投稿規定 (1981年8月)

(目的)

この規定は広島県衛生研究所業務年報等編集委員会要項に基づいてこれを定める。

(投稿資格)

広島県衛生研究所研究報告の論文の著者は原則として広島県衛生研究所職員とする。

(掲載内容)

1. 本誌は原則として広島県衛生研究所において行なった研究・調査の業績を掲載する。
2. 論文は未発表のものに限り、内容は次のとおりとする。
  - (1) 総説 …… 内容形式は自由とする。
  - (2) 原著 …… オリジナリティのあるものに限る。
  - (3) ノート …… オリジナリティのあるもので(2)にまとも得ないもの。
  - (4) 資料 …… 調査結果をまとめたものとする。

(論文執筆要領)

1. 論文原稿は原則としてA4判400字詰の原稿用紙を用い表題、著者名、緒言、方法、結果、考察、結語および文献等の順序に書くものとする。表題については和文でタイトル、氏名、続いて欧文でタイトル、氏名の順に記し、所属については欄外に和名続いて欧名で記すものとする。本文は表題、著者名、所属の書き終わった後に3行あけて書き始めること。原著、ノートについては250語までの欧文抄録をタイプ用紙で付すこと。
2. 図表はA4判の用紙を用い、図の場合は図の下にそれぞれの一連番号を欧文で Fig. 1., 表の場合は表の上に Table 1. のようにつけ表題を、また、説明が必要な場合は図、または表の下に欧文で説明等を付けるものとする。本文中の図表のそう入位置は本文中に3行をあけて2行目にそう入図表の指示を赤筆で記す。ただし原著、ノート以外のものについては図表のタイトル説明を欧文にする必要はない。

3. 謝辞は本文の次に1行あけて書きはじめる。


1行あける

4. 引用文献は本文中に〔1-4〕のように表わし、引用順に末尾に一括して記載する。

文献の書き方

理化学系

- 1) 雑誌：著者名：タイトル（略してもよい）、雑誌名、巻（号）頁、年（西暦）。
- 2) 単行本：著者名（編集者名、訳者名、監修者名）：書名（版）、編集（監修者名）母体、出版社名、発行地、発行年（西暦）、頁。

生物学系

- 1) 雑誌：著者名（西暦年）：タイトル（略してもよい）、雑誌名、巻（号）、頁（1-5）。
- 2) 単行本：著者名（編集者名、訳者名、監修者名）（西暦年）：書名（版）、頁（P. 1-5）、発行地、発行書店。

5. 論文は平かな現代かな使いにより横書きとし、句読点は（.）（,）とする。以上の執筆要領のほかは日本薬学雑誌および日本細菌学雑誌等の執筆規定に準ずるものとする。
6. 原稿枚数は原則として総説40枚、原著および資料30枚、ノート10枚以内とする。

(論文の受理および採否)

1. 論文は各部の編集委員を通じて編集委員会に提出する。
2. 論文の採否は編集委員会の責任で決定する。

(校正)

校正は三校までとし、内容の変更は認めない。

(別刷)

論文1編につき50部とする。

例


} 3行

編 集 委 員 会

武 井 直 巳 (委員 長)  
天 川 充 弘 (総 務 部)  
妹 尾 正 登 (生物 学部)  
水 田 満 里 (病理 学部)  
金 森 久 幸 (理 化 学 部)  
小 川 博 美 (食品 衛生 部)

広島県衛生研究所研究報告

第 35 号

1988年11月発行

発行所 広島県衛生研究所

広島市南区字品神田1丁目5-70

〒734・電話(082)251-4371

印刷所 (株)柳盛社印刷所

広島市中区東白島町8-23

〒730・電話(082)221-2148

